

Molekularbiologische und biochemische
Untersuchungen zur Biosynthese von
Mykotoxinen aus Ascomyceten

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Marco Matuschek
aus Oberhausen

Marburg/Lahn, 2012

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am 18. Juni 2012.

Erstgutachter: Prof. Dr. Shu-Ming Li

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Keusgen

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juni 2012

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	V
Vorträge.....	VI
Abkürzungen	VII
Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1 Die Geschichte des Mutterkorns.....	5
1.2 Strukturelle Eigenschaften der Ergotalkaloide	6
1.2.1 Trizyklische Vorläufer der Ergotalkaloide (6,7-Secoergolene)	7
1.2.2 Amid-Derivate der D-Lysergsäure (Ergoamide)	7
1.2.3 Peptid-Derivate der D-Lysergsäure (Ergopeptine)	8
1.2.4 Clavinalkaloide bzw. Clavine	8
1.3 Biologische und pharmakologische Wirkungen der Ergotalkaloide	9
1.4 Produzenten von Ergotalkaloiden.....	10
1.4.1 Allgemeines.....	10
1.4.2 <i>Claviceps purpurea</i>	11
1.4.3 <i>Penicillium commune</i>	12
1.4.4 <i>Aspergillus fumigatus</i>	13
1.5 Biosynthesewege der Ergotalkaloide.....	15
1.6 Biosynthese der Alkaloide vom Fumitremorgin-Typ.....	17
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Chemikalien, Säulenmaterial und Kits.....	20
2.1.2 Enzyme.....	21
2.1.3 Mikroorganismen	21
2.1.4 Plasmide und Oligonukleotide	22
2.1.5 Kultivierungsbedingungen und Nährmedien	25
2.1.6 Puffer und Lösungen	27
2.2 Bioinformatische Analysen	30

2.3	Molekularbiologische Methoden.....	31
2.3.1	Isolierung von RNA aus Pilzen und Herstellung von cDNA.....	31
2.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Alkalische Lyse).....	31
2.3.3	Restriktion von Plasmid-DNA	32
2.3.4	Agarosegelelektrophorese	32
2.3.5	Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
2.3.7	Herstellung kompetenter Zellen	35
2.3.8	DNA-Sequenzierung	36
2.4	Biochemische Methoden	36
2.4.1	Genexpression und Zellaufschluss	36
2.4.2	Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose bzw. Kobalt-Resin	37
2.4.3	Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)	38
2.4.4	Aufreinigung von FtmPT1 für Kristallisationsversuche	39
2.4.5	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.4.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	40
2.4.7	Enzymatische Reaktionsansätze.....	40
2.5	Analytik niedermolekularer Substanzen.....	42
2.5.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	42
2.5.2	Umkehr-Phasen-HPLC (<i>reverse phase</i> HPLC).....	43
2.5.3	Massenspektrometrie (MS)	44
2.5.4	Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Vorkommen von Ergotalkaloidgenclustern innerhalb der Ascomyceten.....	45
3.1.1	Identifizierung der Ergotalkaloidgencluster	45
3.1.2	Anordnung der Gene in den Ergotalkaloidgenclustern	46
3.1.3	Proteinsequenzvergleiche der orthologen Ergotalkaloidgene	47
3.1.4	Phylogenetische Analyse.....	50
3.2	Klonierung, Expression und Aufreinigung.....	51
3.2.1	Klonierung und Expression von <i>ftmO</i> aus <i>A. fumigatus</i>	51
3.2.2	Optimierung der Aufreinigung von FtmPT1 aus <i>A. fumigatus</i>	54
3.2.3	Klonierung von <i>fgaDH</i> und <i>fgaOx3</i> aus <i>A. fumigatus</i>	55

3.2.4	Klonierung und Expression von <i>fgaFS</i> aus <i>A. fumigatus</i>	56
3.2.5	Klonierung und Expression von <i>fgaOx1</i> aus <i>A. fumigatus</i>	59
3.2.6	Klonierung und Expression von <i>easE</i> aus <i>C. purpurea</i>	68
3.2.7	Klonierung und Expression von <i>easG</i> und <i>easA</i> aus <i>C. purpurea</i>	69
3.2.8	Klonierung und Expression von <i>fgaFS_{pc}</i> und <i>fgaOx3_{pc}</i> aus <i>P. commune</i>	72
3.3	Versuche zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von FtmO aus dem Biosynthesegencluster der Alkaloide vom Fumitremorgin-Typ	76
3.4	Versuche zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von FgaOx1	77
3.5	Versuche zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von FgaFS	78
3.6	EasG katalysiert in Gegenwart von reduziertem Glutathion (GSH) die Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Agroclavin	79
3.6.1	Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von EasG und EasA	79
3.6.2	Strukturaufklärung von Agroclavin	82
3.6.3	Bestimmung des Molekulargewichts von EasG-His ₆	83
3.6.4	Nicht-enzymatische Reaktion von GSH mit Chanoclavin-I-Aldehyd	83
3.6.5	Abhängigkeit der EasG-Reaktion von der Proteinkonzentration und der Zeit ..	86
3.6.6	Enzymatische Aktivität von EasG in Anwesenheit von FgaOx3	87
3.7	Untersuchungen zur Kontrolle der Stereochemie bei der Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin und Pyroclavin.....	88
3.7.1	Strukturaufklärung von Pyroclavin	90
3.8	Nachweis der enzymatischen Aktivität von FgaFS _{pc} und FgaOx3 _{pc}	92
3.8.1	Bestimmung des Molekulargewichts von FgaOx3 _{pc} und FgaFS _{pc}	93
3.8.2	Stereoselektivität der Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin und Pyroclavin.....	94
4.	Diskussion	97
4.1	Vorkommen von Ergotalkaloidgenclustern innerhalb der Ascomyceten.....	97
4.2	Untersuchungen zur Biosynthese der Alkaloide vom Fumitremorgin-Typ	98
4.3	Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von FgaOx1 bzw. EasE	99
4.4	Reaktionsmechanismus von EasG in Gegenwart von reduziertem Glutathion für die Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Agroclavin.....	100
4.5	Untersuchungen zur Kontrolle der Stereochemie bei der Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin und Pyroclavin.....	102
4.5.1	Postulierter Reaktionsmechanismus.....	102

4.5.2	Verzweigungspunkte der Ergotalkaloidbiosynthesewege von <i>C. purpurea</i> , <i>A. fumigatus</i> und <i>P. commune</i>	103
4.5.3	Festlegung der Stereochemie von (8 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-Fumigaclavin C in <i>A. fumigatus</i> und (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-Fumigaclavin A in <i>P. commune</i>	106
5.	Literaturverzeichnis.....	107
6.	Anhang	114
6.1	Multi-Proteinsequenzvergleiche der orthologen Ergotalkaloidgene	114
6.2	Phylogenetische Stammbäume der orthologen Ergotalkaloidgene	131
6.3	Vergleich der FgaFS-Sequenz des NCBI-Eintrags mit der FGENESH- Vorhersage.....	135
6.4	Vergleich der FgaOx1-Sequenz des NCBI-Eintrags mit der FGENESH- Vorhersage.....	136
6.5	Klonierungsstrategie für das Gen <i>fgaOx1</i>	137
6.6	Multi-Proteinsequenzvergleiche	138
6.6.1	FgaOx1 und EasE.....	138
6.6.2	FgaFS _{pc} , FgaFS und EasG.....	139
6.6.3	FgaOx3 _{pc} , FgaOx3 und EasA	139
6.7	Primärsequenzanalyse von FtmO	140
6.8	NMR-Spektren von Agroclavin.....	141
6.9	ESI-MS-Spektren des isolierten Agroclavins und des Chanoclavin-I-Aldehyd- DTT Intermediats	155
6.10	NMR-Spektren des isolierten Pyroclavins	156
6.11	MS-Spektrum des isolierten Pyroclavins	167
6.12	Membrandomänen-Vorhersagen für FgaOx1 und EasE.....	168
	Danksagung	170
	Curriculum vitae.....	171

Publikationsliste

Marco Matuschek, Christiane Wallwey, Beate Wollinsky, Xiulan Xie and Shu-Ming Li (2012), *In vitro* conversion of chanoclavine-I aldehyde to the stereoisomers festuclavine and pyroclavine was controlled by the second reduction step, RSC Advances, Volume 2, Issue 9, 3662-3669, DOI: 10.1039/C2RA20104F

Marco Matuschek, Christiane Wallwey, Xiulan Xie and Shu-Ming Li (2011), New insights into ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea*: An agroclavine synthase EasG catalyses, *via* a non-enzymatic intermediate with reduced glutathione, the conversion of chanoclavine-I aldehyde to agroclavine, Organic and Biomolecular Chemistry, Volume 9, Issue 11, 4328-4335, DOI: 10.1039/c0ob01215g

Marco Matuschek and Shu-Ming Li, Tryptophanyl aminopeptidase 7-DMATS-type peptidase, Handbook of Proteolytic Enzymes, in Druck, ISBN: 978-0-12-382219-2

Marco Matuschek, Christiane Wallwey and Shu-Ming Li, Distribution of genes for ergot alkaloid biosynthesis in different fungi, in Vorbereitung

Xiulan Xie, Christiane Wallwey, **Marco Matuschek**, Klaus Steinbach and Shu-Ming Li (2011), Formyl migration product of chanoclavine-I aldehyde in the presence of the old yellow enzyme FgaOx3 from *Aspergillus fumigatus*: a NMR structure elucidation, Magnetic Resonance in Chemistry, Volume 49, Issue 10, 678-681, DOI: 10.1002/mrc.2796

Jost M, Zocher G, Tarcz S, **Matuschek M.**, Xie X, Li SM, Stehle T. (2010), Structure-function analysis of an enzymatic prenyl transfer reaction identifies a reaction chamber with modifiable specificity, Journal of the American Chemical Society Volume 132, 17849-17858, DOI: 10.1021/ja106817c

Christiane Wallwey, **Marco Matuschek**, Xiulan Xie and Shu-Ming Li (2010), Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Conversion of chanoclavine-I aldehyde to festuclavine by the festuclavine synthase FgaFS in the presence of the old yellow enzyme FgaOx3, Organic and Biomolecular Chemistry, Volume 8, 3500-3508, DOI: 10.1039/c003823g

Yin WB, Xie XL, **Matuschek M.**, Li SM. (2010), Reconstruction of pyrrolo[2,3-b]indoles carrying an alpha-configured reverse C3-dimethylallyl moiety by using recombinant enzymes, Organic and Biomolecular Chemistry, Volume 8, 1133-1141, DOI: 10.1039/b922440h

Christiane Wallwey, **Marco Matuschek** and Shu-Ming Li (2010), Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: conversion of chanoclavine-I to chanoclavine-I aldehyde catalyzed by a short-chain alcohol dehydrogenase FgaDH, Archives of Microbiology, Volume 192, Number 2, 127-134, DOI: 10.1007/s00203-009-0536-1

Vorträge

Marco Matuschek, Christiane Wallwey, Xiulan Xie and Shu-Ming Li

EasG and FgaFS are key enzymes in the differentiation of ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea* and *Aspergillus fumigatus*

Vortrag, Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 18.-21. März 2012, Tübingen

Marco Matuschek, Christiane Wallwey and Shu-Ming Li

The biosynthesis of ergot alkaloids in *Aspergillus fumigatus* and *Claviceps purpurea*

Vortrag, Projektbezogener Personenaustausch des DAAD und des China Scholarship Council, September 2010, Zhejiang Universität Hangzhou

Marco Matuschek and Shu-Ming Li

Evolution of aromatic prenyltransferases in the biosynthesis of indole derivatives

Vortrag, Finales Colloquium des DFG Priority Programms SPP1152 "Evolution of Metabolic Diversity", 03.-05. April 2009, Freising

Abkürzungen

A	Adenin
<i>A.b.</i>	<i>Arthroderma benhamiae</i>
<i>A.f.</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. benhamiae</i>	<i>Arthroderma benhamiae</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. gypseum</i>	<i>Arthroderma gypseum</i>
<i>A. otae</i>	<i>Arthroderma otae</i>
AS	Aminosäure(n)
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
BCRP	breast cancer resistance protein
bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
c	Konzentration
C	Cytosin
<i>C. fusiformis</i>	<i>Claviceps fusiformis</i>
<i>C. hirtella</i>	<i>Claviceps hirtella</i>
<i>C.p.</i>	<i>Claviceps purpurea</i>
<i>C. paspali</i>	<i>Claviceps paspali</i>
<i>C. purpurea</i>	<i>Claviceps purpurea</i>
Cam ^R	Chloramphenicol-Resistenz
Carb	Carbenicillin
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
d	Duplett
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Duplett vom Duplett
ddd	Duplett vom Duplett vom Duplett
ddt	Duplett vom Duplett vom Triplet
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMAT	Dimethylallyltryptophan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase I	Deoxyribonuclease I (Desoxyribonuklease I)
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
dt	Duplett vom Triplet
DTT	1,4-Dithiothreitol
DQF-COSY	Double-quantum filtered-Correlation Spectroscopy
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E.f.</i>	<i>Epichloë festucae</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylenediamintetraessigsäure)

<i>E. festucae</i>	<i>Epichloë festucae</i>
<i>E. glyceriae</i>	<i>Epichloë glyceriae</i>
<i>E. typhina</i>	<i>Epichloë typhina</i>
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidiert)
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	Fast protein liquid chromatography
G	Guanin
GSH	Glutathion
gDNA	genomische DNA
His ₆	Hexahistidin
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactopyranosid
J	Kopplungskonstante
Km ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen
LB	Lysogeny broth
LSD	Lysergsäurediethylamid
M	molar
m	Multiplett
<i>M.a.</i>	<i>Metarhizium acridum</i>
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
mRNA	messenger RNA
<i>M. acridum</i>	<i>Metarhizium acridum</i>
<i>M. anisopliae</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>
MS	Massenspektrometrie
NAD ⁺ /NADH	Nikotinamadenindinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
NADP ⁺ /NADPH	Nikotinamadenindinukleotidphosphat (oxidierte/reduzierte Form)
NaOH	Natriumhydroxid
<i>N. fischeri</i>	<i>Neosartorya fischeri</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat
nm	Nanometer
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernresonanz-Spektroskopie)
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame (Offener Leserahmen)
<i>P. commune</i>	<i>Penicillium commune</i>
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>P. ipomoeae</i>	<i>Periglandula ipomoeae</i>
PP _i	Pyrophosphat

ppm	parts per million
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase A	Ribonuclease A (Ribonuklease A)
ROESY	Rotating-frame Overhauser effect spectroscopy
RP	reverse phase
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Singulett
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
t	Triplett
T	Thymin
<i>T. equinum</i>	<i>Trichophyton equinum</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
<i>T. tonsurans</i>	<i>Trichophyton tonsurans</i>
<i>T. verrucosum</i>	<i>Trichophyton verrucosum</i>
R _t	Retentionszeit
td	Triplett vom Duplett
TB	Terrific Broth
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	Unit
UV	ultraviolett
üN	über Nacht
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
V	Volt
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
× g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

Zusammenfassung

Die Sekundärmetabolit-Produktion der Pilze stellt eine wichtige Quelle von biologisch aktiven Stoffen dar. Besonders häufig finden sich diese Stoffe bei den filamentösen Pilzen, die im Erdboden leben und bioaktive Moleküle im Konkurrenzkampf gegen andere Mikroorganismen bilden. Innerhalb der Sekundärmetabolite besitzen die Ergotalkaloide sowohl pharmazeutisch-nützliche als auch toxische Eigenschaften. Die Ergotalkaloide gehören zu den Indolalkaloiden, die hauptsächlich von Pilzen der Gattungen *Claviceps*, *Aspergillus* und *Penicillium* gebildet werden. Momentan ist *Claviceps purpurea* (*C. purpurea*) einer der wichtigsten Stämme für die industrielle Ergotalkaloidproduktion, die sich zurzeit auf 20 Tonnen pro Jahr beläuft. *C. purpurea* produziert hauptsächlich die Ergotalkaloide Ergotamin, Ergocryptin und verwandte Ergopeptine. Im Gegensatz dazu wurden aus *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) und *Penicillium commune* (*P. commune*) die Clavinalkaloide, darunter Festuclavin, Pyroclavin und die Fumigaclavine A, B und C, isoliert. Ein gemeinsames strukturelles Merkmal dieser Substanzen ist das tetrazyklische Ergolinringsystem.

Bioinformatische Analysen der Ergotalkaloidgencluster aller drei Pilze führten zu der Identifizierung von sieben homologen Genen. Es wurde vermutet, dass die sieben homologen Gene für die Bildung des Ergolinringsystems verantwortlich sind. Vor dem Beginn dieser Dissertation wurde bereits die Funktion von zwei der sieben homologen Gene aus *A. fumigatus* biochemisch nachgewiesen. Diese Gene wurden den ersten beiden Schritten im Biosyntheseweg zugeordnet. Im weiteren Verlauf der Biosynthese stellt Chanoclavin-I-Aldehyd, ein trizyklischer Vorläufer der Ergotalkaloide, einen Verzweigungspunkt dar. In *C. purpurea* wird Ergotamin und in *A. fumigatus* bzw. *P. commune* Fumigaclavin C bzw. A gebildet. Das Ergotamin enthält einen Tripeptidrest, während die Fumigaclavine keinen enthalten. Stattdessen finden sich bei letzteren andere Substituenten, z.B. eine Alkohol- oder Acetoxy-Gruppe an C-9 und eine reverse Prenylierung an C-2. Zusätzlich unterscheiden sich Fumigaclavin C aus *A. fumigatus* bzw. Fumigaclavin A aus *P. commune* stereochemisch an der Position C-8 des Ergolinrings.

In dieser Arbeit wurde das Vorkommen von Ergotalkaloidgenclustern innerhalb der Ascomyceten untersucht. Dabei wurden aus 53 verschiedenen Pilzfamilien 138 in der NCBI-Datenbank verfügbare Pilzgenome auf Sequenzhomologien zu den sieben orthologen Genen von *A. fumigatus* und *C. purpurea* analysiert. Es wurden insgesamt 23 Pilze identifiziert, die putative Ergotalkaloidgencluster enthielten. Diese 23 Pilze verteilen sich innerhalb der Ascomyceten auf drei Familien. Die Familie Clavicipitaceae gehört zur Klasse der Sordariomyceten und die Familien Trichocomaceae und Arthrodermataceae zu den Eurotiomyceten. Zusätzlich zu den bekannten Ergotalkaloidproduzenten wurden Ergotalkaloidgencluster in einigen Pilzen identifiziert, aus denen keine Ergotalkaloide bekannt sind, wie z.B. die Familie Arthrodermataceae bzw. die Gattung *Metarhizium* der Familie Clavicipitaceae.

Zum funktionellen Nachweis wurde das Gen *fgaOx1* aus *A. fumigatus* und sein Homolog *easE* aus *C. purpurea* untersucht. Beide Gene wurden in Expressionsvektoren kloniert und Expressionsbedingungen in *Escherichia coli* (*E. coli*) getestet. Für das Gen *fgaOx1* wurde ebenfalls die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) angestrebt. Leider blieben die Expressionsversuche der beiden Gene erfolglos. Weitere Proteinsequenzanalysen von FgaOx1 ergaben, dass wahrscheinlich zwei Membrandomänen vorhanden sind. Im Falle des Gens *easE* ergaben sich während der Untersuchungen der Pilzgenome der Ascomyceten neue Ergebnisse. Wahrscheinlich ist die Intron-Exon-Struktur innerhalb der NCBI-Datenbank fehlerhaft.

Die Verzweigungspunkte der Ergotalkaloidbiosynthesen in *C. purpurea*, *A. fumigatus* und *P. commune* wurde durch diese Arbeit weiter aufgeklärt. Durch die Expression der Gene *easA* und *easG* aus *C. purpurea* und deren Aufreinigung sowie der biochemischen Charakterisierung der kodierten Proteine konnte gezeigt werden, dass Chanoclavin-I-Aldehyd in Gegenwart von reduziertem Glutathion durch EasG allein zu Agroclavin umgesetzt wird. Für diesen Schritt war keine Beteiligung von EasA nötig, vielmehr scheint das Protein EasA seine Funktion evolutionär verloren zu haben. In dem postulierten Reaktionsmechanismus von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Agroclavin werden ein Isomerisierungs- und ein Reduktionsschritt benötigt. Es konnte gezeigt werden, dass die Isomerisierung durch ein nicht-enzymatisches Intermediat von Chanoclavin-I-Aldehyd mit Glutathion (GSH) vollzogen wird. Die Reduktion hingegen erfolgt enzymatisch durch das Protein EasG, das als Iminreduktase fungiert. Für die Katalyse benötigt EasG den Kofaktor NADPH. Die Struktur des Agroclavins wurde eindeutig durch NMR- und MS-Analysen identifiziert.

Durch die Kombination von FgaOx3 aus *A. fumigatus* mit EasG aus *C. purpurea* konnte gezeigt werden, dass beide Proteine zusammen die Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin und seinem Stereoisomer Pyroclavin katalysieren. Zuvor war nur bekannt, dass FgaOx3 und FgaFS aus *A. fumigatus* zusammen Festuclavin bilden. Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen erfolgte die Amplifikation und anschließende Expression der orthologen Gene *fgaOx3_{pc}* und *fgaFS_{pc}* aus *P. commune* NRRL2033 und die Aufreinigung beider Proteine. Die Kombination aller Orthologen lieferte neue Erkenntnisse über den Reaktionsmechanismus und damit auch über den Verzweigungspunkt der Ergotalkaloidbiosynthese in *A. fumigatus* und *P. commune*. Im Unterschied zum Reaktionsmechanismus in *C. purpurea* werden in *A. fumigatus* und *P. commune* zwei Reduktionsschritte für die Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin und Pyroclavin benötigt. Dabei katalysieren FgaOx3 bzw. FgaOx3_{pc} den ersten und die Iminreduktasen FgaFS bzw. FgaFS_{pc} den zweiten Reduktionsschritt. Im Gegensatz zu früher veröffentlichten Hypothesen einer anderen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Iminreduktasen FgaFS bzw. FgaFS_{pc} die Stereochemie der Gesamtreaktion festlegen und nicht die auch als *old yellow enzymes* bekannten Reduktasen FgaOx3 bzw. FgaOx3_{pc}. Zudem wird durch die jeweilige Iminreduktase das Produktverhältnis zwischen Festuclavin und Pyroclavin festgelegt.

Summary

Fungi are rich sources of secondary metabolites. These substances are often produced by soil-dwelling filamentous fungi, which exist as communities competing with other microorganisms. Among these secondary metabolites, the ergot alkaloids are both pharmaceutically useful and toxic. Ergot alkaloids are indole derivatives produced by fungi of the genera *Claviceps*, *Aspergillus* and *Penicillium* with *Claviceps purpurea* (*C. purpurea*) as the most important producer for medical use. *C. purpurea* produces ergotamine and ergocryptine as main ergot alkaloids. The clavine-type alkaloids, e.g. festuclavine, pyroclavine and fumigaclavines A, B and C are mainly produced by the fungi *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) and *Penicillium commune* (*P. commune*). A common structural feature of most ergot alkaloids is the tetracyclic ergoline ring system.

Seven orthologous genes were identified in ergot alkaloid gene clusters of all three fungi mentioned above by a bioinformatic approach. It was postulated that these seven orthologous genes are involved in the early steps towards the ergoline ring. Two of these seven genes, which are involved in the first steps of the ergot alkaloid biosynthesis from *A. fumigatus*, were characterized biochemically before the beginning of this work. Chanoclavine-I-aldehyde is then a branch point of ergot alkaloid biosynthesis for ergotamine in *C. purpurea* and fumigaclavines C and A, respectively in *A. fumigatus* and *P. commune*. Ergotamine is characterized by a peptide moiety which is absent in the fumigaclavines. Instead, the fumigaclavines contain additional substituents, e.g. alcohol or acetoxy group at C-9 and a reverse prenyl moiety at C-2. Furthermore, the C-8 stereochemistry of fumigaclavine C from *A. fumigatus* and fumigaclavine A from *P. commune* differs.

In this study, the presence of genes for ergot alkaloid biosynthesis in ascomycetous fungi was investigated. For this purpose, 138 available genomes of 53 fungi families of the NCBI database were screened with the sequences of the seven orthologous genes from *C. purpurea* and *A. fumigatus*. 23 ascomycetous fungi belonging to the families Trichocomaceae, Clavicipitaceae and Arthrodermataceae were identified to contain putative ergot alkaloid gene clusters. The family Clavicipitaceae is assigned to the class of Sordariomycetes, whereas the families Trichocomaceae and Arthrodermataceae are members of the class of Eurotiomycetes. The two identified fungi of the genus *Metarhizium* belong to the family Clavicipitaceae. Until now, no ergot alkaloids have been isolated from fungi neither of the genus *Metarhizium* nor of fungi of the family Arthrodermataceae.

To prove functions, the gene *fgaOx1* from *A. fumigatus* and its orthologue *easE* from *C. purpurea* were cloned into expression vectors for *Escherichia coli* (*E. coli*). In case of *fgaOx1* *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) was also tested as expression strain. Unfortunately, no overexpression was detectable under different conditions. Additional protein sequence analysis indicated that FgaOx1 contains two membrane domains. Furthermore, analy-

sis of genes of ergot alkaloid biosynthesis in ascomycetous fungi revealed that the intron-exon structure for *easE* from *C. purpurea* is incorrect in the NCBI database.

The investigations of key enzymes from *C. purpurea*, *A. fumigatus* and *P. commune* in this study provided new insights in the differentiation of ergot alkaloid biosynthesis. The expression of the genes *easA* and *easG* from *C. purpurea* and the purification and biochemical characterization of the recombinant proteins showed that EasG alone catalyses, *via* a non-enzymatic adduct with reduced glutathione, the conversion of chanoclavine-I aldehyde to agroclavine. The overproduced EasA seems inactive and may lose its function during evolution. A reaction mechanism was proposed for the conversion of chanoclavine-I aldehyde to agroclavine, whereas one isomerisation and one reduction step was necessary. It was demonstrated that EasG was responsible for the reduction step and a non-enzymatic adduct with reduced glutathione (GSH) for the isomerisation. NADPH was required as cofactor for the EasG reaction. The structure of agroclavine was unequivocally elucidated by NMR and MS analyses.

By using a combination of FgaOx3 from *A. fumigatus* and EasG from *C. purpurea* it was demonstrated that both enzymes catalyse the reaction from chanoclavine-I aldehyde to festuclavine and pyroclavine. It had been shown previously, that FgaOx3 and FgaFS from *A. fumigatus* together produce only festuclavine. For detailed investigations on the conversion of chanoclavine-I aldehyde to festuclavine and pyroclavine the orthologues of *fgaOx3* and *fgaFS* from *P. commune* NRRL2033, *fgaOx3_{pc}* and *fgaFS_{pc}*, were amplified and expressed. The combinations of all orthologues from *C. purpurea*, *A. fumigatus* and *P. commune* revealed that in *A. fumigatus* and *P. commune*, in contrast to the reaction mechanism in *C. purpurea*, two reduction steps are required for the conversion of chanoclavine-I aldehyde to festuclavine and pyroclavine. It was shown that FgaOx3 or FgaOx3_{pc} catalysed the first reduction step and the imine reductases FgaFS, FgaFS_{pc} or EasG the second. More importantly, the ratio of pyroclavine to festuclavine was controlled by the reduction of an imine intermediate catalysed by FgaFS, FgaFS_{pc} or EasG, and not by the reduction step catalysed by the old yellow enzymes FgaOx3 or FgaOx3_{pc}.

1. Einleitung

1.1 Die Geschichte des Mutterkorns

Seit dem frühen Mittelalter finden sich in Europa zahlreiche, gut dokumentierte Aufzeichnungen über Massenvergiftungen hervorgerufen durch die Inkorporation des Mutterkorns (Flieger *et al.*, 1997; Gröger & Floss 1998; Haarmann *et al.*, 2009; Schiff 2006). Das Ausmaß solcher, heute auch als Ergotismus-Epidemien bezeichneten Massenvergiftungen, beziffert eine sehr frühe Referenz in der französischen Region Aquitanien aus dem Jahre 944 n. Chr. mit 20000 Toten, was zur damaligen Zeit der Hälfte der Gesamtpopulation Aquitaniens entsprach (Schiff 2006). Zu den Vergiftungen bei Menschen kam es durch den Verzehr von Roggenbrot, das mit dem Mutterkorn kontaminiert war.

Dass es sich bei dem Mutterkorn um einen parasitären Pilz handelt, wurde erst im Jahre 1853 durch Louis Rene Tulasne (Tulasne 1853) entdeckt, der dem Pilz seinen heutigen Namen *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne (*C. purpurea*) gab und den Lebenszyklus des Pilzes (Kap. 1.4.2.1) beschrieb (Gröger & Floss 1998). Zuvor hatte man angenommen, dass das schwarze Gebilde an den Roggenähren ein besonders gestaltetes Roggenkorn sei (Abb. 1-1), wodurch auch der Name der Droge, *Secale cornutum* („gehörnter Roggen“), zustande kam (Schmersahl 2010). Die Droge ist das Dauermycel bzw. die Sklerotiumform des Pilzes, welches die Ergotalkaloide, die zu den Indolalkaloiden gehören, enthält.



Abb. 1-1: Sklerotium von *C. purpurea* auf einer Roggenähre. Bildquelle: R. Altenkamp, „www.wikipedia.de“, 19. Juli 2009.

Ein weiterer Meilenstein in der Geschichte der Ergotalkaloide war die Isolierung des Ergotamin durch Arthur Stoll im Jahre 1918 (Stoll 1918). Die industrielle Produktion von Ergotamin-Tartrat durch die Firma Sandoz im Jahre 1921 leitete ein neues Kapitel in der Geschichte der Ergotalkaloide ein (Haarmann *et al.*, 2009). 1938 folgte die Synthese des semisynthetischen Lysergsäurediethylamid (LSD) durch Albert Hofmann. Mittlerweile sind das Ergotamin und sein semisynthetisches Derivat Dihydroergotamin seit langer Zeit in klinischer Anwendung (siehe auch Kap. 1.3) (Lovell & Marmura 2010; Robertson *et al.*, 2010). Es sei erwähnt, dass auch in der heutigen Zeit Kontaminationen durch Ergotalkaloide immer noch ein Problem in der Landwirtschaft bzw. Nahrungsmittelindustrie darstellen, das hohe Kosten für Beseitigungsprozesse und ständige Kontrollen erfordert (Haarmann *et al.*, 2009; Krska & Crews 2008).

1.2 Strukturelle Eigenschaften der Ergotalkaloide

Wie zuvor erwähnt, handelt es sich bei den Ergotalkaloiden um Indolalkaloide, die z.B. in den Sklerotia von *C. purpurea* zu finden sind und als Sekundärmetabolite von verschiedenen Pilzen gebildet werden (Kap. 1.4). Sekundärmetabolite sind niedermolekulare Substanzen, die nicht nur von Pilzen, sondern auch von Bakterien und Pflanzen produziert werden (Khaldi *et al.*, 2010). Häufig finden sich diese Stoffe bei den filamentösen Pilzen, die im Erdboden leben und dort mit unterschiedlichen Mikroorganismen in Konkurrenz um Nährstoffe, Mineralien und Wasser stehen (Keller & Hohn 1997). Dabei sind die Sekundärmetabolite anders als die Primärmetabolite nicht für das Wachstum, die Entwicklung und die Reproduktion des Pilzes essentiell. Sie sollen den Pilz stattdessen vor verschiedenen Umwelteinflüssen schützen bzw. zur Verteidigung gegen andere Organismen dienen (Khaldi *et al.*, 2010).

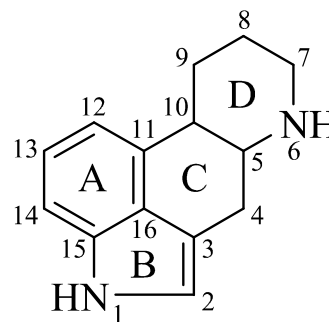


Abb. 1-2: Tetrazyklisches Ergolinringsystem mit den Ringen A bis D, das die meisten natürlichen Ergotalkaloide als gemeinsames strukturelles Merkmal besitzen.

Ein gemeinsames strukturelles Element der Ergotalkaloide ist das in Abb. 1-2 dargestellte tetrazyklische Ergolinringsystem (Jacobs & Gould, Jr. 1937). Die natürlichen Ergotalkaloide besitzen zudem eine Methylierung an N-6, unterschiedliche Substituierungen an C-8 und ein β -konfiguriertes H-5. Außerdem weisen viele Ergotalkaloide eine Doppelbindung zwischen C-8 und C-9 bzw. zwischen C-9 und C-10 auf. Demnach liegen sie als 6,8-dimethyl- $\Delta^{8,9}$ - bzw. 6,8-dimethyl- $\Delta^{9,10}$ -ergolen Derivate vor. In diesen Derivaten besitzt H-10 α -Konfiguration und liegt somit *trans* zu H-5 mit β -Konfiguration (Gröger & Floss 1998).

Die Ergotalkaloide lassen sich anhand ihrer Struktur in drei Gruppen einteilen, die Amid-Derivate der D-Lysergsäure (Ergoamide), die Peptid-Derivate der D-Lysergsäure (Ergopeptine) und die Clavinalkaloide bzw. Clavine (Wallwey & Li 2011). Die Abb. 1-3 zeigt zum direkten Vergleich jeweils ein Beispiel eines Ergoamids (Lysergsäure- α -Hydroxyethylamid), eines Ergopeptins (Ergovalin) und eines Clavinalkaloids ((8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A).

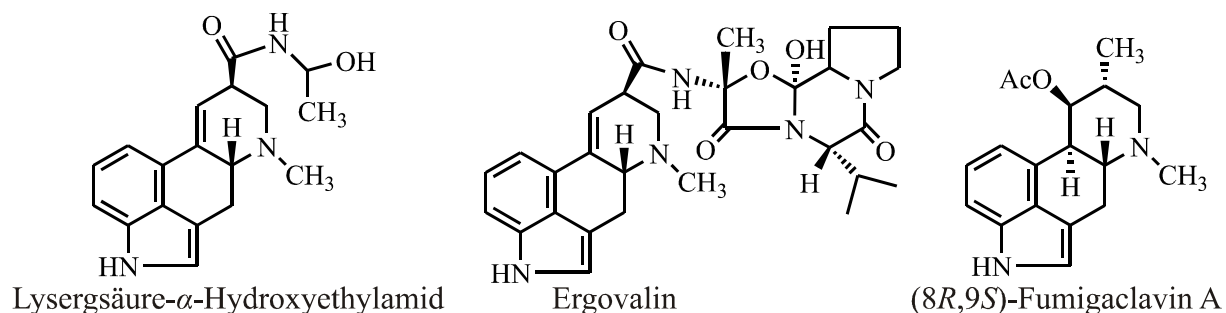


Abb. 1-3: Beispiel eines Ergoamids (Lysergsäure- α -Hydroxyethylamid), eines Ergopeptins (Ergovalin) und eines Clavinalkaloids ((8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A).

Die folgenden Kapitel gehen näher auf jede der drei Gruppen ein. Zunächst werden die trizyklischen Vorläufer der Ergotalkaloide, die 6,7-Secoergolene, beschrieben.

1.2.1 Trizyklische Vorläufer der Ergotalkaloide (6,7-Secoergolene)

Bei den natürlich vorkommenden 6,7-Secoergolenen handelt es sich um trizyklische Vorläufer der Ergotalkaloide, bei denen der Ring D des Ergolinringsystems (Abb. 1-2) noch nicht geschlossen ist. Als erste dieser Substanzen wurde das Chanoclavin-I isoliert (Abb. 1-2), welches ursprünglich als Chanoclavin bezeichnet wurde (Hofmann *et al.*, 1957). Später wurden jedoch die Stereoisomere Isochanoclavin-I und Chanoclavin-II gefunden (Stauffacher & Tschertter 1964), wodurch eine Neubezeichnung erfolgen musste. Schließlich konnte im Jahre 1980 Chanoclavin-I-Aldehyd (Abb. 1-2) aus *C. purpurea* isoliert werden (Maier *et al.*, 1980).

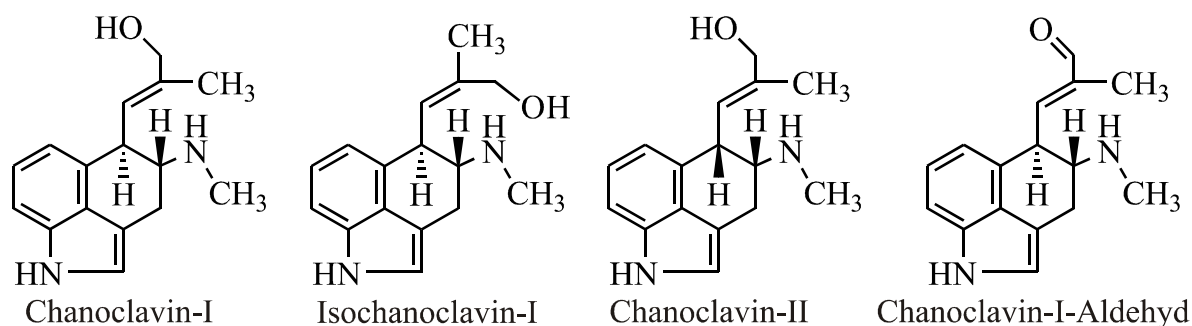


Abb. 1-4: Beispiele für trizyklische 6,7-Secoergolene.

1.2.2 Amid-Derivate der D-Lysergsäure (Ergoamide)

Bei den Ergoamiden handelt es sich, wie auch bei den im nächsten Kapitel (1.2.3) beschriebenen Ergopeptinen, um Derivate der D-Lysergsäure. Im Gegensatz zu den Ergopeptinen besitzen die Ergoamide nur einfache Alkylamid-Gruppen (Abb. 1-5). Als erstes Ergotalkaloid dieser Gruppe wurde 1935 das Propanolamid der D-Lysergsäure aus einer wässrigen Fraktion eines Kulturextraktes von *C. purpurea* isoliert (Gröger & Floss 1998). Es wurde in der Literatur auch als Ergonovin, Ergobasin und Ergometrin bezeichnet. Aus saprophytischen Kulturen von *Claviceps paspali* (*C. paspali*) konnte das Lysergsäure- α -Hydroxyethylamid (Abb. 1-3) und das Lysergsäureamid (Ergin) (Abb. 1-5) gewonnen werden (Arcamone *et al.*, 1961).

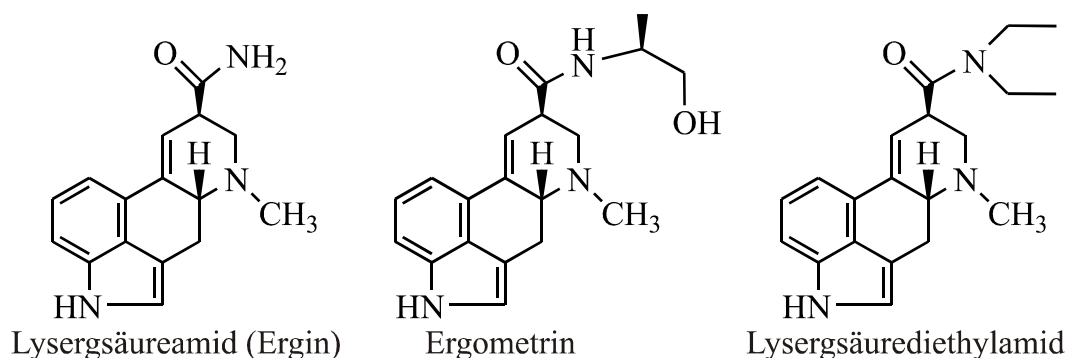
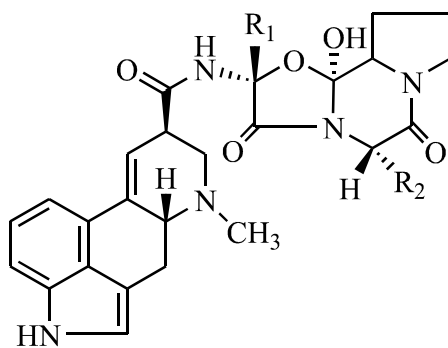


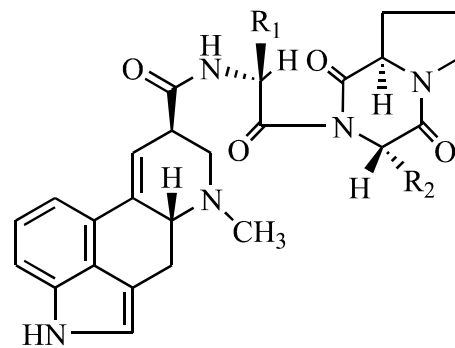
Abb. 1-5: Beispiele für Ergotalkaloide aus der Gruppe der Ergoamide.

1.2.3 Peptid-Derivate der D-Lysergsäure (Ergopeptine)

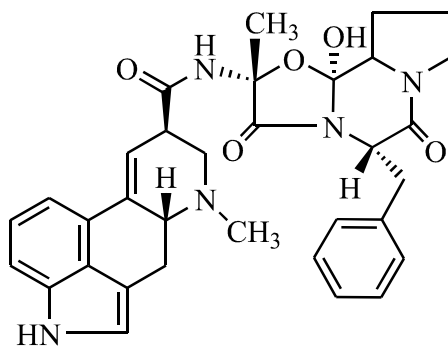
Die Ergopeptine, die aus den Ergopeptamen (Abb. 1-6) entstehen, zeichnet aus, dass sie alle Derivate der D-Lysergsäure sind, die einen trizyklischen Tripeptidrest mit Prolin besitzen (Gröger & Floss 1998). Die verschiedenen Ergopeptine (Abb. 1-6) unterscheiden sich untereinander an den mit R1 und R2 gekennzeichneten Positionen. Der Peptidrest des Ergotamins (Abb. 1-6) beispielweise enthält die Aminosäuren L-Alanin, L-Phenylalanin und L-Prolin. Im Vergleich zu den Ergopeptinen weist der Peptidrest bei den Ergopeptamen eine bizyklische Form auf (Gröger & Floss 1998) und es liegt ein D-Prolin statt des L-Prolins vor (Uhlig & Petersen 2008). Als erstes Ergopeptam wurde 1973 das Ergocristam isoliert (Abb. 1-6) (Stütz *et al.*, 1973). Bei dieser Substanz enthält der Peptidrest die Aminosäuren L-Valin, L-Phenylalanin und D-Prolin.



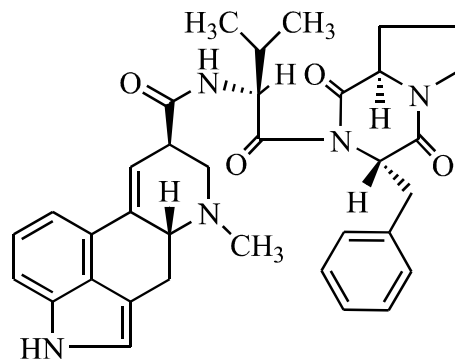
Allgemeine Struktur
der Ergopeptine



Allgemeine Struktur
der Ergopeptame



Ergotamin



Ergocristam

Abb. 1-6: Allgemeine Struktur der Ergopeptine mit dem Beispiel Ergotamin und allgemeine Struktur der Ergopeptame mit Ergocristam als Beispiel.

1.2.4 Clavinalkaloide bzw. Clavine

Die Gruppe der Clavinalkaloide bzw. Clavine wurde mit der Entdeckung des Agroclavins (Abb. 1-7) gegründet (Abe 1951). Das Agroclavin wurde aus den Sklerotia und einer parasitären saprophytischen Kultur eines Pilzes auf *Agropyrum semicostatum* (Nees) isoliert. Im Vergleich zu den Ergotalkaloid-Derivaten der D-Lysergsäure liegt die Doppelbindung im Ring D statt zwischen C-9 und C-10 zwischen C-8 und C-9 (Agroclavin und Elymoclavin

(Abb. 1-7)) vor oder sie ist nicht vorhanden (z.B. Festuclavin oder Costaclavin (Abb. 1-7)). Die Fumigaclavine enthalten hingegen weitere Substituenten, z.B. eine Alkohol- oder Acetoxy-Gruppe an C-9 und eine reverse Prenylierung an C-2 (Wallwey & Li 2011).

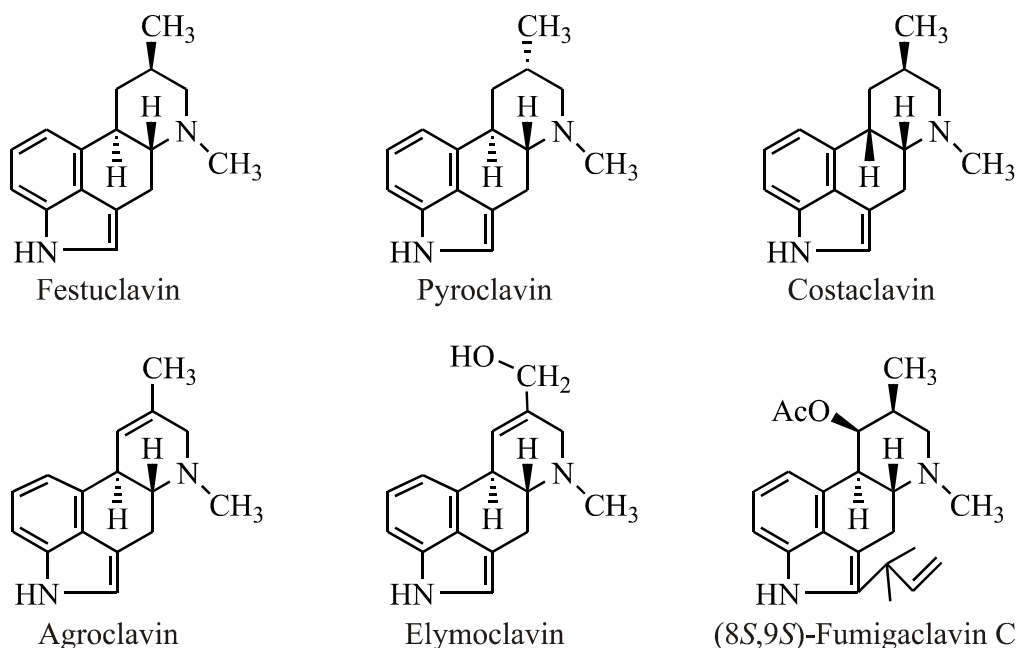


Abb. 1-7: Beispiele für Ergotalkaloide aus der Gruppe der Clavine.

Leider herrscht in der Literatur in Bezug auf die Stereochemie an Position C-8 der Fumigaclavine bzw. deren Benennung keine Einheitlichkeit. Sowohl (8*S*,9*S*)- als auch (8*R*,9*S*)-Fumigaclavine wurden als Fumigaclavin A, B oder C bezeichnet (Cole *et al.*, 1977a; Flieger *et al.*, 1997; Frisvad *et al.*, 2009; Ge *et al.*, 2009; Kawai *et al.*, 1992; Ohmomo *et al.*, 1989; Zhao *et al.*, 2004). Des Weiteren wurden (8*S*,9*R*)-Diastereomere von Fumigaclavin A und B als Isfumigaclavin A und B und auch als Roquefortin A und B bezeichnet (Cole *et al.*, 1983; O'Brien *et al.*, 2006). Zur Lösung dieses Problems wurde von Wallwey & Li daher vorgeschlagen, dass *RS*-System für C-8 und C-9 zur Unterscheidung der Fumigaclavine anzuwenden (Wallwey & Li 2011). Dieser Vorschlag wurde in dieser Arbeit übernommen.

1.3 Biologische und pharmakologische Wirkungen der Ergotalkaloide

Ergotalkaloide sind Mykotoxine, die bei einer Dosis von 5 bis 10 g für den Menschen tödlich sind (Roth *et al.*, 2001; Schmersahl 2010). Dies führte im Mittelalter zu schweren Massenvergiftungen, die im Kapitel 1.1 erwähnt wurden. Es konnten während der Ergotismus-Epidemien zwei unterschiedliche Verlaufsformen beobachtet werden, die als gangränös und konvulsiv bezeichnet wurden (Hänsel & Pertz 2009). Bei beiden Verlaufsformen traten Würgereiz, Erbrechen, Kopfschmerzen und Fehlempfindungen des Hautsinnes in Form von Kribbeln auf. Bei dem gangränösen Krankheitsverlauf kam es schließlich zu schmerzhaften arteriellen Durchblutungsstörungen der Extremitäten, die meist zum Verlust dieser führte. Einher

ging der gangränöse Ergotismus mit Verfärbungen der Haut und unerträglich brennenden Schmerzen, wodurch im Mittelalter auch die Bezeichnung „Sankt-Antonius-Feuer“ entstand. Der konvulsive Ergotismus manifestiert sich hingegen in minuten- bis stundenlangen Krampfanfällen. Eine genaue Ursache für die beiden möglichen Verlaufsformen konnte nie genau aufgeklärt werden.

Mit Beginn der 1920er Jahre bis in die heutige Zeit sind die Ergotalkaloide vor allem wegen ihrer positiven Eigenschaften in der Medizin von Bedeutung. Sie stellen wirkungsvolle Arzneistoffe dar, die seit langer Zeit in klinischer Anwendung sind. Die Wirkung liegt in der strukturellen Ähnlichkeit verschiedener Ergotalkaloide zu den drei Neurotransmittern Dopamin, Noradrenalin und Serotonin (5-Hydroxytryptamin) begründet (Haarmann *et al.*, 2009). Damit stellen die dopaminergen, serotonergen und α -adrenergen Rezeptoren die Angriffsorte der Ergotalkaloide dar. Die Wirkungsbeschreibung stellt sich durch die große Anzahl an Subtypen dieser Rezeptoren kompliziert dar (Hänsel & Pertz 2009). Die Ergotalkaloide wirken entweder als Agonisten oder als Antagonisten, wobei die Affinität zu den Rezeptoren von gering bis hoch variiert. Problematischer für die Anwendung beim Menschen ist aber die geringe Rezeptorspezifität und -selektivität der Substanzen (Hänsel & Pertz 2009).

Trotz dieser Nachteile, findet z.B. Ergometrin (Abb. 1-5) wegen seiner besonders ausgeprägten Uteruswirkung während der Rückbildungs- und Heilungsvorgängen in der Wochenbettperiode Anwendung. Ergotamin (Abb. 1-6), bei dem als erstes eine pharmakologische Wirkung nachgewiesen wurde, wird als Migränetherapeutikum genutzt. Die Substanz war das erste spezifisch wirkende Migränemedikament. Mittlerweile werden jedoch an dessen Stelle häufig synthetische Triptane verwendet (Hänsel & Pertz 2009). Für Festuclavin, Pyroclavin, Agroclavin und Elymoclavin (Abb. 1-7) konnte gezeigt werden, dass sie als Antagonisten bzw. partielle Agonisten bei 5-HT_{2A} Rezeptoren von Rattenschwanz-Arterien und als Antagonisten bei α -adrenergen Rezeptoren von Rattenaorten wirken (Pertz 1996). (8S)-9-Deacetoxyfumigaclavin C und (8S,9S)-9-Deacetylumigaclavin C zeigten eine selektive wirksame Zytotoxizität gegen humane Leukämiezellen (Ge *et al.*, 2009) und (8R,9S)-Fumigaclavin C bewirkte eine Relaxation bei isolierten Rattenaorten-Ringen (Ma *et al.*, 2006).

1.4 Produzenten von Ergotalkaloiden

1.4.1 Allgemeines

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden Ergotalkaloide aus Pilzen zweier Familien isoliert, den Clavicipitaceen und den Trichocomaceen (Gröger & Floss 1998; Schardl *et al.*, 2006). Beide Familien gehören zur Abteilung Ascomycota (Schlauchpilze), die allgemein auch als Ascomyceten bezeichnet werden. Die Ascomyceten bilden sehr wahrscheinlich die größte Gruppe von Pilzen (Webster & Weber 2007). Das charakteristische Merkmal aller Vertreter dieser Abteilung ist die Bildung von sexuellen Sporen in einem Ascus (Schlauch). Die asexuelle

Vermehrung mittels Konidien ist unter den Ascomyceten ebenfalls weit verbreitet. Das vegetative Wachstum kann, wie z.B. bei *Saccharomyces cerevisiae* (*cerevisiae*) (Bäckerhefe), durch Sprossung oder aber auch durch Bildung eines Mycel bestehend aus septierten Hyphen erfolgen. Manche Ascomyceten wechseln auch von der einen in die andere Form und zurück (Webster & Weber 2007).

Zurzeit sind *C. purpurea*, *Claviceps fusiformis* (*C. fusiformis*) und *C. paspali* die wichtigsten Stämme für die industrielle Produktion von Ergotalkaloiden. Dabei dient *C. purpurea* hauptsächlich zur Produktion von Ergopeptinen, *C. fusiformis* für Lysergsäure-Derivate und *C. paspali* für Clavine (Haarmann *et al.*, 2009). Für das Jahr 2010 belief sich die geschätzte, weltweite Gesamtproduktion von Ergotalkaloiden auf 20 Tonnen. Dabei wurde die traditionelle Feldkultivierung, aber auch die industrielle Fermentation für die Produktion genutzt (Hulvova *et al.*, 2012). Neben den zuvor genannten Stämmen produzieren auch *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) und *Penicillium commune* (*P. commune*) Ergotalkaloide (Kap. 1.4.3 und 1.4.4.4).

1.4.2 *Claviceps purpurea*

Der Pilz *C. purpurea* zählt zur Familie der Clavicipitaceen, die der Unterabteilung der Pezizomycotina (Echte Schlauchpilze) angehören. Die Mitglieder der Gattung *Claviceps* befallen mehr als 600 verschiedene Monokotyledonen, unter denen sich bedeutende Nutzpflanzen wie Roggen, Weizen, Gerste und Reis befinden (Haarmann *et al.*, 2009). Wie bereits im Kapitel 1.1 erwähnt, wird *C. purpurea* im Deutschen allgemein auch als Mutterkornpilz bezeichnet. Im Englischen bzw. Französischen hat sich offenbar wegen der Ähnlichkeit zum Hahnenstorn geschichtlich die Bezeichnung „Ergot Fungus“ (franz.: ergot [Sporn]) durchgesetzt (Hänsel & Pertz 2009). Das Wort „Ergot“ fand dann später auch Verwendung in der Benennung vieler Inhaltsstoffe der Droge. Neben dem schon genannten Roggen, kann *C. purpurea* auch parasitisch auf weiteren Gattungen der Poaceen (Süßgräsern) wie *Agropyrum* (Quecke), *Elymus* (Haargerste), *Festuca* (Schwingel) und *Phragmites* (Schilf) leben. Cyperaceen (Sauergräser) und Juncaceen (Binsengewächse) werden nur selten befallen (Hänsel & Pertz 2009).

1.4.2.1 Der Lebenszyklus von *Claviceps purpurea*

Der Lebenszyklus von *C. purpurea* beginnt mit dem Wachstum der lang gestielten, kugelförmigen Stromata (Fruchtkörper) aus dem Sklerotium, das dem Pilz zur Überwinterung dient (Abb. 1-8). Innerhalb der Stromata findet die Bildung von ovalen Perithezien statt, die die Asci mit jeweils acht dünnen Askosporen enthalten. Die Askosporen werden durch den Wind verbreitet und infizieren die Narben von beispielsweise Roggenblüten, wenn sie auf diesen

landen. Einmal auf der Wirtspflanze angelangt (Primärinfektion), werden Pilzfäden ausgebildet, die den gesamten Fruchtknoten mit einem konidienbildenden Mycel bedecken.

Das Mycel des Pilzes veranlasst die Pflanze den Honigtau zu bilden, eine zuckerhaltige, zähe Flüssigkeit. Die Konidien werden ca. 7 Tage nach der Primärinfektion sekretiert und vermischen sich mit dem Honigtau. Insekten werden von dem Honigtau angelockt, die dann weitere Pflanzen mit dem Pilz infizieren (Sekundärinfektion). Mit zunehmendem Verbrauch des Fruchtknotens entwickelt sich ein kompaktes Hyphengeflecht, das das konidienbildende Mycel verdrängt. Am Ende entsteht durch diesen Vorgang erneut ein Sklerotium, das aus der Ähre herausragt (Abb. 1-1) und den Pilz wieder überwintern lässt (Hänsel & Pertz 2009).



Abb. 1-8: Sklerotium von *C. purpurea* mit gestielten Fruchtkörpern. Quelle: Wigandsche Drogensammlung der Universität Marburg.

1.4.2.2 Ergotalkaloide aus *Claviceps purpurea*

C. purpurea produziert hauptsächlich die Ergotalkaloide Ergotamin (Stoll 1918) (Abb. 1-6), Ergocryptin (Stoll & Hofmann 1943) und verwandte Ergopeptine (Haarmann *et al.*, 2009). Zusätzlich wurden Zwischenprodukte des Biosynthesewegs der Ergotalkaloide gefunden, wie Agroclavin (Abe 1951), Elymoclavin (Abe *et al.*, 1952) (Abb. 1-7), und die trizyklischen 6,7-Secoergolene Chanoclavin-I und Chanoclavin-I-Aldehyd (Maier *et al.*, 1980) (Abb. 1-4).

1.4.3 *Penicillium commune*

P. commune ist ein anamorpher Schimmelpilz und gehört zur Familie der Trichocomaceen. Er ist in der Natur weit verbreitet und kann an warmen und feuchten Orten im Boden und in der Luft gefunden werden. Isoliert wurde der Pilz auch auf Obst und im Wurzelbereich von Pflanzen (Vinokurova *et al.*, 2003). Bei einer Analyse von Nahrungsmittelabfällen von privaten Haushalten wurde er auf Käse, Nüssen, Fleisch und in Speisefetten gefunden (Rundberget *et al.*, 2004). Es besteht die Möglichkeit, dass *P. commune* allergische Reaktionen, darunter Fließschnupfen, Husten, Nesselfieber oder Asthma, auslöst (Bundesamt 2006).

1.4.3.1 Ergotalkaloide und weitere Mycotoxine aus *Penicillium commune*

Aus *P. commune* NRRL2033 (*P. commune* F-3088) konnten die Ergotalkaloide Fumigaclavin A und B, Festuclavin, Pyroclavin, Agroclavin und das 6,7-Secoergolene Chanoclavin-I isoliert werden (Vinokurova *et al.*, 2003). Für das Fumigaclavin A aus *P. commune* NRRL2033 wur-

de die Stereochemie als (8*R*,9*S*) bestimmt (Unsöld & Li 2006). Weiterhin konnten die Neurotoxine Roquefortin und Penitrem A (Wagener *et al.*, 1980) und das Mycotoxin Cyclopiazonsäure (Hermansen *et al.*, 1984) isoliert werden.

1.4.4 *Aspergillus fumigatus*

1.4.4.1 Allgemeines

A. fumigatus gehört wie *P. commune* zur Familie der Trichocomaceen und ist ein saprophytischer Pilz, der ubiquitär im Erdboden vorkommt. Der Pilz wächst und überlebt auf verrottendem, organischen Material (Latge 1999), wobei seine primäre ökologische Funktion im Recycling von Kohlenstoff und Stickstoff liegt (Millner *et al.*, 1977; Wilson *et al.*, 2002). Dabei zeigt er eine breite Toleranz der Wachstumstemperatur von 20 °C bis 50 °C (Millner *et al.*, 1977), die wohl auch das Vorhandensein des Pilzes in Komposthaufen erklärt (Tekaia & Latgé 2005). Neben der hauptsächlich vorgefundenen, asexuellen Reproduktion über Konidienbildung, konnten O’Gorman *et al.* auch einen sexuellen Reproduktionszyklus mit der Produktion von Askosporen für *A. fumigatus* nachweisen (O’Gorman *et al.*, 2009).

1.4.4.2 *Aspergillus fumigatus* als Auslöser von Krankheiten

Die Konidien von *A. fumigatus* kommen in hoher Zahl, ubiquitär in der Atmosphäre vor (Latge 1999). Dies erreicht der Pilz durch eine starke, kontinuierliche Sporulation, die letztendlich dazu führt, dass der Mensch im Laufe eines Tages mehrere Hundert der Konidien einatmet (Hospenthal *et al.*, 1998). Da die Konidien einen Durchmesser von 2 bis 3 µm besitzen, können sie die Lungenalveolen überwinden. Bei einem gesunden Menschen werden sie jedoch durch das Immunsystem eliminiert (Latge 1999). Durch die Fähigkeit von *A. fumigatus* bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem Infektionen auszulösen, ist der Pilz mittlerweile zum häufigsten, durch die Luft übertragenen Pathogen geworden (O’Gorman *et al.*, 2009). Dabei beträgt die Sterblichkeitsrate bei den Patienten mit geschwächtem Immunsystem über 50 % (Hohl & Feldmesser 2007).

Momentan ist noch nicht geklärt, durch welche Eigenschaften der Pilz so erfolgreich in der menschlichen Lunge mit ihren rauen Bedingungen überlebt (Willger *et al.*, 2009). Es wird jedoch vermutet, dass nicht ein einzelnes Gen, sondern verschiedene Faktoren in die Pathogenität involviert sind (Hohl & Feldmesser 2007). Dabei könnte unter Anderem die erwähnte, breite Hitzetoleranz (Bhabhra *et al.*, 2004), die Oberflächenbeschaffenheit der Konidien (Jahn *et al.*, 1997) oder auch die Pigmentbiosynthese (Tsai *et al.*, 1998) des Pilzes eine Rolle spielen. Auch eine Beteiligung des Sekundärmetabolits Gliotoxin wird im Zusammenhang mit der Pathogenität diskutiert. Dabei zeigten *A. fumigatus*-Stämme, die kein Gliotoxin produzierten, im Vergleich zu Gliotoxin-produzierenden Stämmen eine verminderte Virulenz (Sutton *et al.*, 1996). Das Ausschalten der nicht-ribosomalen Peptidsynthetase (*gliP*) aus dem putativen

Gliotoxingencluster reduzierte ebenfalls die Virulenz eines *A. fumigatus*-Stammes (Sugui *et al.*, 2007). Neben den Problemen, die *A. fumigatus* als Pathogen hervorruft, können die Konidien aber auch als Allergen wirken, das z.B. Asthma und allergische Nasennebenhöhlenentzündungen hervorrufen kann (Latge 1999; O'Gorman *et al.*, 2009).

1.4.4.3 Sekundärmetabolite aus *A. fumigatus*

Die Bedeutung des Gliotoxins aus *A. fumigatus* wurde bereits im vorherigen Kapitel beschrieben. Weitere Sekundärmetabolite aus *A. fumigatus* sind Fumagilin, Pseurotin A, Tryptochivalin (Frisvad 1989) und Cyclopiazonsäure (Hermansen *et al.*, 1984). Die Cyclopiazonsäure ist ein neurotoxisches Mycotoxin, welches als starker Inhibitor der Ca^{2+} -ATPase des Endoplasmatischen Retikulums fungiert (Kim *et al.*, 2012).

Von Bedeutung sind auch die Alkaloide vom Fumitremorgin-Typ aus *A. fumigatus*, darunter Fumitremorgin A und B (Yamazaki *et al.*, 1971), Tryprostatin A und B (Cui *et al.*, 1995) und Verruculogen (Frisvad 1989). Bei den Fumitremorginen handelt es sich um prenylierte Indolalkaloide, die 1971 erstmals aus *A. fumigatus* isoliert wurden und im Rahmen der damaligen Experimente Mäusen injiziert wurden (Yamazaki *et al.*, 1971). Da sie bei Versuchstieren Tremor und Krämpfe auslösten, wurden die Substanzen als Fumitremorgine bezeichnet. Für die Tryprostatine A und B konnte eine Hemmung der Topoisomerase II und für Tryprostatin A sowie Fumitremorgin C eine Inhibition des BCRP (*breast cancer resistance protein*) nachgewiesen werden (Jain *et al.*, 2008). Die Biosynthese der Alkaloide vom Fumitremorgin-Typ wird im Kap. 1.6 ausführlicher beschrieben. Weiterhin ist *A. fumigatus* ein Produzent von Ergotalkaloiden, auf die das folgende Kapitel näher eingeht.

1.4.4.4 Ergotalkaloide aus *Aspergillus fumigatus*

Als erste Ergotalkaloide wurden die Clavinalkaloide (Abb. 1-7) Festuclavin, Fumigaclavin A und Fumigaclavin B aus *A. fumigatus* isoliert (Spilsbury & Wilkinson 1961). Im Jahre 1977 wurde die Isolierung von Fumigaclavin C (Cole *et al.*, 1977b) berichtet. Es wurden jedoch noch keine Untersuchungen zur Stereochemie der Substanzen durchgeführt. Erst später wurde (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin B aus *A. fumigatus* (Ohmomo *et al.*, 1989) beschrieben. 2009 konnten Ge *et al.* (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin C, (8*S*)-9-Deacetoxyfumigaclavin C und (8*S*,9*S*)-9-Deacetylumigaclavin C isolieren (Ge *et al.*, 2009). Von den trizyklischen Vorläufern der Ergotalkaloide (Abb. 1-4) wurde beispielsweise Chanoclavin-I in *A. fumigatus* gefunden (Flieger *et al.*, 1997).

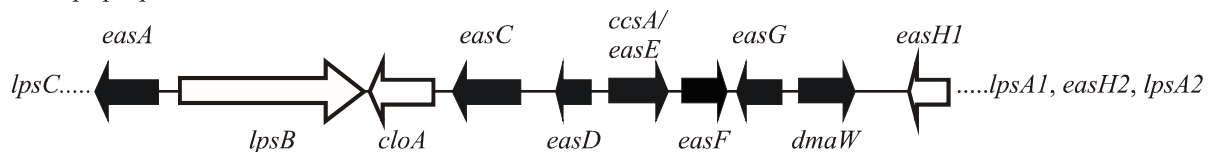
Robinson & Panaccione berichteten kurz vor Fertigstellung dieser Arbeit von der Analyse von 13 *A. fumigatus* Isolaten im Hinblick auf ihr Ergotalkaloid-Profil (Robinson & Panaccione 2012). Angaben zur Stereochemie der gefundenen Ergotalkaloide fehlten jedoch. In fünf Isolaten (Af293, FGSC A1141, NRRL166, NRRL5587 und NRRL5109) wurde Fumigaclavin C

als Endprodukt der Ergotalkaloid-Biosynthese gefunden. Sechs Isolate (FGSC A1461, B5233, NRRL164, NRRL5517, NRRL163 und NRRL6113) produzierten wie *P. commune* (Kap. 1.4.3.1) Fumigaclavin A. In einem *A. fumigatus* Isolat (NRRL165) konnten nur die trizyklischen Vorläufer Chanoclavin-I und Chanoclavin-I-Aldehyd gefunden werden. *A. fumigatus* NRRL174 zeigte keine detektierbare Produktion von Ergotalkaloiden. Die Ergebnisse der Arbeit verdeutlichen die Diversität, die bereits bei Pilzen derselben Art vorhanden sein kann.

1.5 Biosynthesewege der Ergotalkaloide

Für *A. fumigatus* Af293 wurde die Genomsequenz, die aus 8 Chromosomen und 9926 vorhergesagten Genen besteht, 2005 von Nierman *et al.* veröffentlicht (Nierman *et al.*, 2005). Es wurden 26 Gencluster identifiziert, die eine Polyketidsynthase bzw. eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase beinhalten. Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, begann die intensive Erforschung der Biosynthese der Ergotalkaloide mit der Isolierung des Ergotamins im Jahre 1918. In den folgenden Jahrzehnten wurden viele weitere Sekundärmetabolite aus *C. purpurea* und anderen Produzenten isoliert. Es erfolgte in den 1960ern bis 1990ern die weitere Erforschung durch umfangreiche Fütterungsexperimente von den Gruppen um Gröger und Floss (Floss *et al.*, 1974; Floss 1976; Gröger & Floss 1998). Der nächste große Schritt erfolgte im Jahre 1999 mit der Identifizierung des Ergotalkaloidgenclusters von *C. purpurea* (Tudzynski *et al.*, 1999) (Abb. 1-9) durch *genomic walking* mit dem Gen *dmaW*, das einige Jahre zuvor entdeckt wurde (Tsai *et al.*, 1995). Das Ergotalkaloidgencluster von *A. fumigatus* (Abb. 1-9), das auf Chromosom 2 lokalisiert ist, konnte dann im Jahre 2005 im Zuge der Charakterisierung von FgaPT2 identifiziert werden (Unsöld & Li 2005).

Claviceps purpurea



Aspergillus fumigatus

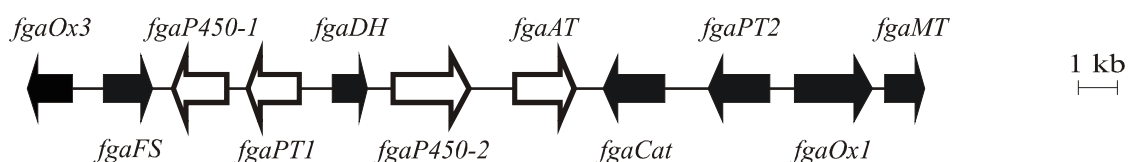


Abb. 1-9: Putative Ergotalkaloidgencluster von *C. purpurea* P1 und *A. fumigatus* Af293. Die sieben orthologen Gene wurden als schwarze Pfeile dargestellt. Das Gencluster von *C. purpurea* wurde nach Lorenz *et al.* modifiziert (2009).

Da die biosynthetischen Gene eines Sekundärmetabolits bei Pilzen und Bakterien meist in Nachbarschaft zueinander liegen, vereinfacht sich die Identifizierung aller beteiligten Gene

eines solchen Genclusters (Keller & Hohn 1997). Das 54,5 kb große Ergotalkaloidgencluster von *C. purpurea* besteht aus insgesamt 14 und das 22,2 kb große Fumigaclavin C Gencluster von *A. fumigatus* aus 11 Genen. Sieben dieser Gene sind Orthologe (Abb. 1-9 schwarze Pfeile), die sehr wahrscheinlich in die Bildung des Ergolinringsystems involviert sind (Unsöld & Li 2005). Durch die vorhandenen Genomsequenzen konnten schließlich die molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen der Ergotalkaloidgene erfolgen. Die Abb. 1-10 zeigt einen Überblick über den putativen Biosyntheseweg von Ergotamin in *C. purpurea* und (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin C in *A. fumigatus*, mit dem Kenntnisstand zu Beginn dieser Arbeit. Beide putativen Biosynthesewege stützen sich dabei auf die Erkenntnisse der umfangreichen Fütterungsexperimente, die unter Anderem gezeigt haben, dass das Ergolinringsystem aus L-Tryptophan und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) hervorgeht (Floss 1976; Gröger & Floss 1998; Schardl *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2000). Die Schritte von L-Tryptophan zu Chanoclavin-I-Aldehyd sind wahrscheinlich in beiden Pilzen identisch. In *C. purpurea* wird schließlich Ergotamin über Agroclavin und in *A. fumigatus* (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin C über Festuclavin gebildet. Biochemisch charakterisiert war zum damaligen Zeitpunkt die Reaktion des ersten Schritts von L-Tryptophan zu 4-L-Dimethylallyltryptophan (4-L-DMAT) durch das Enzym FgaPT2 aus *A. fumigatus* (Unsöld & Li 2005) bzw. DmaW in *C. fusiformis* (Tsai *et al.*, 1995). 4-L-DMAT wird wiederum durch FgaMT methyliert, was zur Bildung von 4-DMA-L-Abrin führt (Rigbers & Li 2008). Schließlich prenyliert FgaPT1 im letzten Schritt des Biosynthesewegs in *A. fumigatus* (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin A zu (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin C (Unsöld & Li 2006).

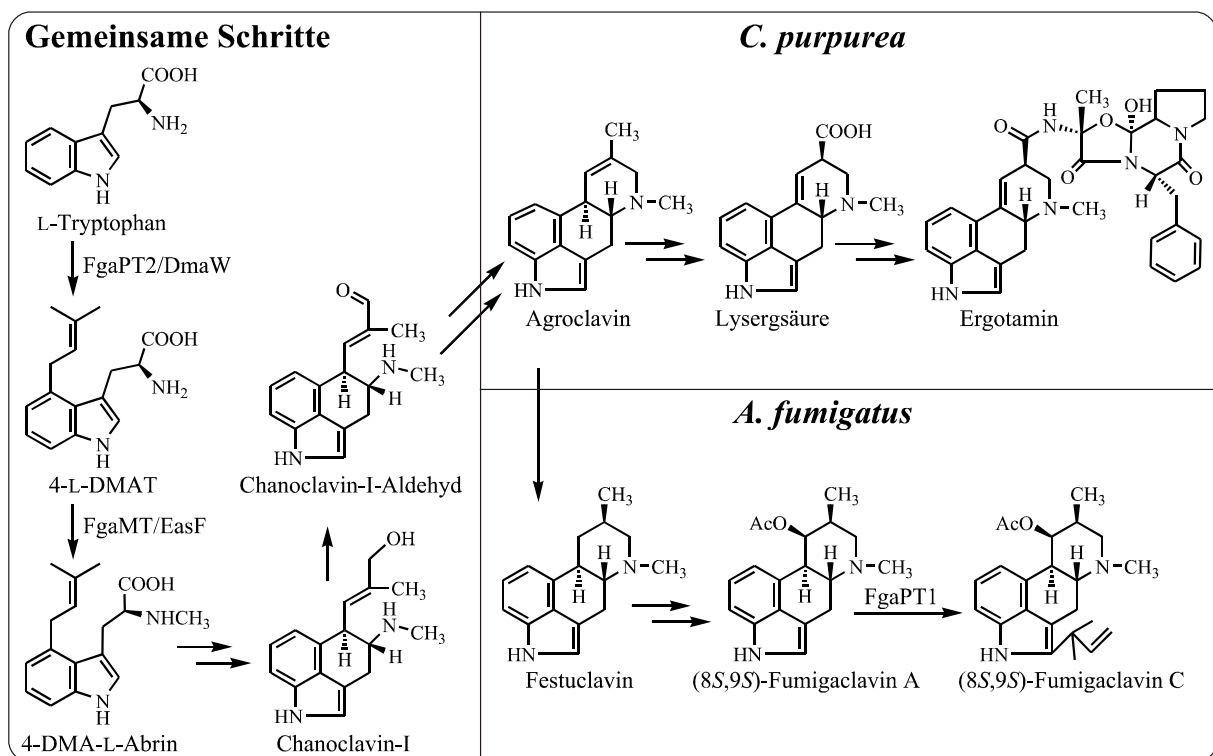


Abb. 1-10: Putativer Biosyntheseweg von Ergotamin in *C. purpurea* und (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin C in *A. fumigatus* zu Beginn dieser Arbeit.

1.6 Biosynthese der Alkaloide vom Fumitremorgin-Typ

In Abb. 1-11 ist das 25 kb große, putative Fumitremorgin-Gencluster von *A. fumigatus* Af293 zu sehen (Grundmann & Li 2005). Das Cluster besteht aus neun Genen und ist auf dem Chromosom 8 lokalisiert. Die Abb. 1-12 zeigt den dazugehörigen, putativen Biosyntheseweg von Verruculogen in *A. fumigatus*.

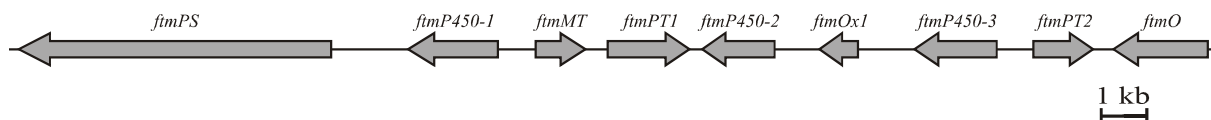


Abb. 1-11: Putatives Fumitremorgin-Gencluster von *A. fumigatus* Af293.

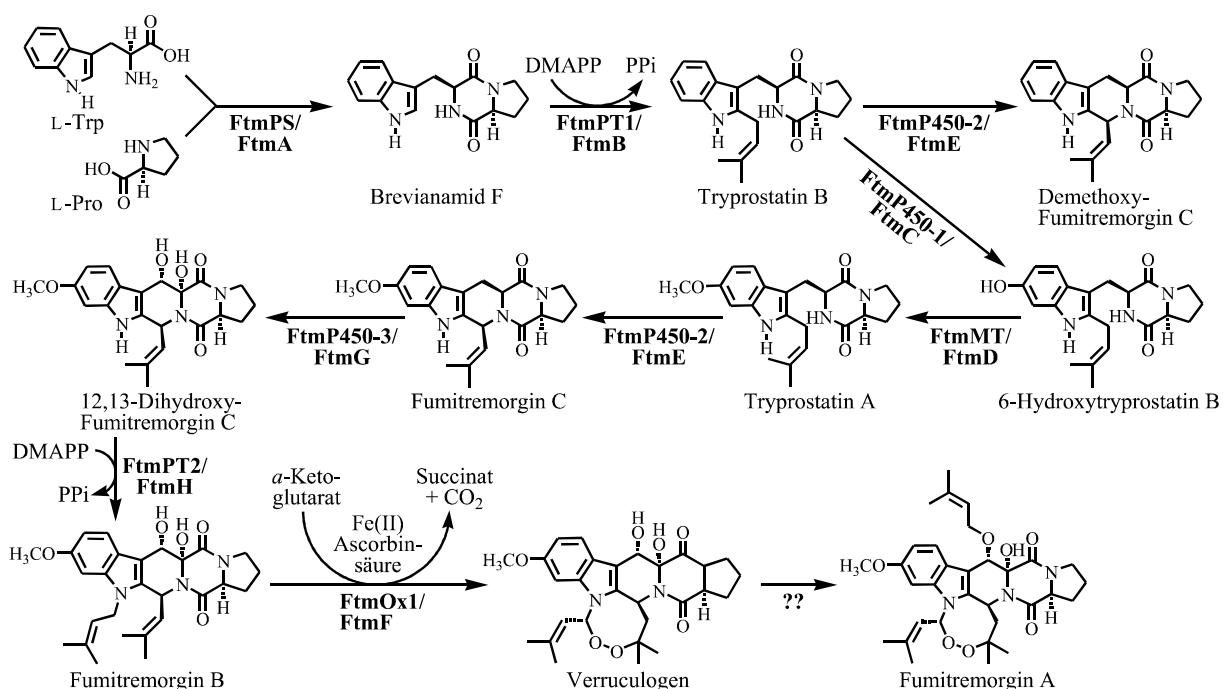


Abb. 1-12: Putativer Biosyntheseweg von Verruculogen bzw. Fumitremorgin A in *A. fumigatus* (modifiziert nach (Li 2011)).

In dem ersten Schritt findet eine Kondensation der Aminosäuren L-Tryptophan und L-Prolin zu Brevianamid F statt, die durch die nicht-ribosomale Peptidsynthetase FtmPS katalysiert wird (Maiya *et al.*, 2006). Das Brevianamid F wird anschließend durch FtmPT1 prenyliert, wodurch Tryprostatin B entsteht (Grundmann & Li 2005). Durch Geninaktivierung konnten Kato *et al.* zeigen, dass die Cytochrom P450-Enzyme FtmP450-1, FtmP450-2 und FtmP450-3 für die Umsetzung von Tryprostatin B zu 6-Hydroxytryprostatin B, Tryprostatin A zu Fumitremorgin C bzw. Fumitremorgin C zu 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C verantwortlich sind (Kato *et al.*, 2009). Die Funktion der putativen Methyltransferase FtmMT wurde bislang noch nicht nachgewiesen, jedoch wurde die Methylierung von 6-Hydroxytryprostatin B zu Tryprostatin A postuliert (Grundmann *et al.*, 2008). Die zweite Prenylierung von 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C zu Fumitremorgin B wird von FtmPT2 katalysiert (Grundmann *et al.*, 2008).

Fumitremorgin B wird dann durch FtmOx1 in Gegenwart von α -Ketoglutarat, Ascorbinsäure, Fe(II) und molekularem Sauerstoff unter Einbau einer Endoperoxid-Brücke zu Verruculogen umgesetzt (Steffan *et al.*, 2009). Im Vergleich zu Verruculogen enthält Fumitremorgin A einen weiteren Prenylrest. Fumitremorgin A konnte aus *A. fumigatus* und *Neosartorya fischeri* (*N. fischeri*) isoliert werden, nicht aber aus *Penicillium*-Stämmen (Frisvad *et al.*, 2009; Horie & Yamazaki 1981; Larsen *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 1988). Bisher wurde Verruculogen wesentlich öfter isoliert als Fumitremorgin A, was für eine genetische Besonderheit der entsprechenden Stämme oder für eine fehlende Expression der benötigten Prenyltransferase in den *Penicillium*-Stämmen spricht. Somit bleibt die Funktion des Gens *ftmO*, das am Ende des Genclusters lokalisiert ist, als einzige ungeklärt. Kato *et al.* spekulierten, dass *ftmO* nicht in die Biosynthese der Alkaloide vom Fumitremorgin-Typ involviert ist (Kato *et al.*, 2009). FtmO sollte daher innerhalb dieser Arbeit untersucht werden (Kap. 1.7).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Folgende Fragestellungen sollten innerhalb dieser Dissertation untersucht werden:

1. Charakterisierung von FtmO aus dem Fumitremorgingencluster von *A. fumigatus*
 - Klonierung von *ftmO* in die Expressionsvektoren pYES2/NT C und pQE-60 mit anschließender Expression des Gens in *E. coli* oder *S. cerevisiae* und Aufreinigung des überproduzierten Proteins
 - Untersuchungen des Proteins auf eine mögliche Prenyltransferase-Aktivität bzw. auf eine Beteiligung des Proteins in den Schritten des Biosyntheseweges von 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C zu Verruculogen
2. Bioinformatische Analyse von Ergotalkaloidgenclustern innerhalb der Ascomyceten
 - Analyse der verfügbaren Pilzgenome der NCBI-Datenbank auf Sequenzhomologien zu den sieben orthologen Genen von *A. fumigatus* und *C. purpurea*
 - Analyse putativer Ergotalkaloidgencluster im Hinblick auf die Intron-Exon-Struktur der sieben homologen Gene
 - Phylogenetische Untersuchungen der Ergotalkaloidgene und der codierten Proteine
3. Biochemische Charakterisierung der Gene *fgaOx1* und *fgaFS* aus dem Ergotalkaloidgencluster von *A. fumigatus*
 - Bioinformatische Analyse der Intron-Exon-Struktur der putativen Gene
 - Amplifikation von *fgaOx1* und *fgaFS* aus cDNA von *A. fumigatus* B5233
 - Klonierung der Gene in Expressionsvektoren mit anschließender Expression der Gene in *E. coli* oder *S. cerevisiae* und Aufreinigung der überproduzierten Proteine
 - Biochemische Charakterisierung von FgaOx1 und FgaFS, darunter Identifizierung des natürlichen Substrats und benötigter Kofaktoren, Isolierung und Strukturaufklärung des enzymatischen Produkts und Postulierung eines Reaktionsmechanismus
4. Aufklärung des Verzweigungspunkts der Ergotalkaloidbiosynthese in *C. purpurea*
 - Klonierung der Gene *easA* und *easG* in einen Expressionsvektor mit anschließender Expression der Gene in *E. coli* und Aufreinigung der überproduzierten Proteine
 - Untersuchung der Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Agroclavin durch EasA und EasG
5. Untersuchung der stereochemischen Unterschiede in der Ergotalkaloidbiosynthese von *A. fumigatus* und *P. commune*
 - Bioinformatische Analyse der Intron-Exon-Struktur der putativen Gene
 - Amplifikation der Gene *fgaOx3_{pc}* und *fgaFS_{pc}* von *P. commune* NRRL2033
 - Klonierung der Gene *fgaOx3_{pc}* und *fgaFS_{pc}* in Expressionsvektoren mit anschließender Expression der Gene in *E. coli* und Aufreinigung der überproduzierten Proteine
 - Biochemische Charakterisierung der Enzyme, darunter Identifizierung des Substrats und benötigter Kofaktoren, Isolierung und Strukturaufklärung des enzymatischen Produkts und Postulierung eines Reaktionsmechanismus

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Säulenmaterial und Kits

Die gebräuchlichen Laborchemikalien wurden von VWR (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Die Ergotalkaloide Agroclavin, Festuclavin und Elymoclavin bzw. deren Vorläufer Chanoclavin-I wurden freundlicherweise von Prof. Leistner (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Das (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A wurde von Beate Wollinsky aus *P. commune* NRRL2033 isoliert. Zusätzlich verwendete Chemikalien und Medienbestandteile sind in Tab. 2-1 aufgelistet. Alle benötigten Materialien zur Säulenchromatographie wurden in Tab. 2-2 und die verwendeten Kits in Tab. 2-3 aufgelistet.

Tab. 2-1: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile.

Hersteller	Substanz
BD (Heidelberg)	Yeast Nitrogen Base without amino acids
Bioline GmbH (Luckenwalde)	dNTP Mix 100 mM
Eurisotop (Saarbrücken)	Chloroform-D ₁ , Methanol-D ₄ , Dimethylsulfoxid-D ₆
Fermentas (St. Leon-Rot)	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactosid (X-Gal)
Fluka (Taufkirchen)	Galaktose
Serva (Heidelberg)	Coomassie Brilliant Blau R-250
Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	L-Abrin, 2-Mercaptoethanol, IGEPAL
Merck (Darmstadt)	L-Tryptophan
Roth (Karlsruhe)	Rotiphorese [®] Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid), Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG), Natriumdodecylsulfat (SDS), 1,4-Dithiothreitol (DTT), D-(+)-Raffinose, Ascorbinsäure, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Tab. 2-2: Verwendete Säulenmaterialien.

Hersteller	Säulenmaterialien
CS Chromatographie Service (Langerwehe)	Multospher RP 18-5 (Fertigsäule, 5 μ m, 250 x 4 mm), Multospher RP 18-5 (Fertigsäule, 5 μ m, 250 x 10 mm)
GE Healthcare (Freiburg)	HiLoad 16/60 Superdex 75 (Fertigsäule), HiLoad 16/60 Superdex 200 (Fertigsäule), Sephadex G-25 PD-10 und NAP-5 (Fertigsäulen)
Merck (Darmstadt)	Analytische DC-Alufohlen Kieselgel 60 F254, Präparative DC-Glasplatten, Aluminiumoxid 60 F254 basisch
Qiagen (Hilden)	Ni-NTA-Agarose
Pierce Biotechnology (Rockford, USA)	HisPur Kobalt-Resin

Tab. 2-3: Verwendete Kits.

Hersteller	Kits
Fermentas (St. Leon-Roth)	GeneRuler DNA Ladder Mix
GE Healthcare (Freiburg)	LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis, Gel Filtration HMW and LMW Calibration Kit
Invitrogen (Karlsruhe)	SYBR [®] Safe DNA Gel stain, <i>S. c.</i> EasyComp [™] Transformation Kit
NEB (Ipswich, USA)	ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Kit
Omega Bio-Tek (Norcross, GA, USA)	E. Z. N. A. Fungal RNA Miniprep Kits
Promega (Mannheim)	pGEM-T Easy Vektor System I
Roche Applied Science (Mannheim)	Expand High Fidelity Plus PCR System
SLG Südlaborbedarf (Gauting)	HiYield PCR Clean-up and Gel-Extraction Kit

2.1.2 Enzyme

Die Tab. 2-4 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme auf.

Tab. 2-4: Verwendete Enzyme.

Hersteller	Enzym
Jena BioScience (Jena)	Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase
Roth (Karlsruhe)	RNase A
Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	Lysozym, Katalase aus <i>Aspergillus niger</i>

2.1.3 Mikroorganismen

2.1.3.1 Bakterienstämme

Eine Liste der verwendeten *E. coli*-Stämme findet sich in Tab. 2-5.

Tab. 2-5: Übersicht über die verwendeten *E. coli*-Stämme.

Anbieter	Bakterienstämme	Genotyp
Stratagene	XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ <i>recA1 endA1gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]
Qiagen (Hilden)	M15[pREB4]	NaI ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺ Km ^R
Invitrogen (Karlsruhe)	BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)
Genlantis	SoluBL21 [™]	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) [†]

[†] Der Stamm enthält uncharakterisierte Mutationen, die durch spezielle Selektionskriterien erhalten wurden. Diese Mutationen führten in vielen getesteten Bedingungen dazu, unlösliche Proteine in eine vollständige oder teilweise lösliche Form zu überführen (Herstellerangabe).

2.1.3.2 Pilzstämme

Die Tab. 2-6 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Pilzstämme auf.

Tab. 2-6: Übersicht über die verwendeten Pilzstämme.

Pilzstämme	Genotyp	Hersteller/ Referenz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1	<i>his3Δ1/his3Δ1 leu2/leu2 trp1-289/ trp1-289 ura3-52/ura3-52</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Claviceps purpurea</i> P1	Wildtypstamm	Prof. Dr. P. Tudzynski, (Münster)
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033 (=VKM F-3088 bzw. =ATCC10477)	Wildtypstamm	NCAUR (Illinois, USA)

2.1.4 Plasmide und Oligonukleotide

Die Tab. 2-7 gibt eine Übersicht über die verwendeten Klonierungs- und Expressionsvektoren.

Tab. 2-7: Klonierungs- und Expressionsvektoren.

Vektor	Beschreibung	Hersteller
pGEM-T Easy	Klonierungsvektor, der in linearer Form mit einem 3'-T-Überhang zum direkten einklonieren von PCR-Produkten mit 3'-A-Überhang verwendet wurde; <i>lacZ</i> , ori, fl ori, Amp ^R	Promega (Mannheim)
pCR2.1	Klonierungsvektor, T7-Promotor, <i>lacZα</i> , pUC-Origin, fl ori, Kan ^R , Amp ^R	Eurofins MWG Operon (Ebersberg)
pBluescript II SK (+)	Klonierungsvektor, T7-Promotor, <i>lacZ</i> , pUC-Origin, fl ori, Amp ^R	Eurofins MWG Operon (Ebersberg)
pQE-60 und pQE-70	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , T5-Promotor, ColE1, Amp ^R , Sequenz für C-terminalen His ₆ -tag	Qiagen (Hilden)
pJexpress411	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , T7-Promotor, <i>lacO1</i> , pUC-Origin, Kan ^R	DNA2.0 (Menlo, USA)
pYES2/NT C	Expressionsvektor für <i>S. cerevisiae</i> , Amp ^R , <i>URA3</i> -Marker, pUC-Origin, fl ori, 2μ-Origin, <i>GAL1</i> -Promotor, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen His ₆ -tag	Invitrogen (Karlsruhe)

In Tab. 2-8 werden alle innerhalb dieser Arbeit erstellten Klonierungs- und Expressionskonstrukte aufgelistet. Ergänzend fasst die Tab. 2-9 die benötigten Oligonukleotide zusammen.

Tab. 2-8: Plasmid-Konstrukte, die innerhalb dieser Arbeit erstellt wurden. Die Expressionskonstrukte wurden fett hervorgehoben.

Plasmid	Beschreibung
pMM001	<i>fgaFS</i> (AFUA_2G17970) im pGEM-T Easy; enthält ein PCR-Produkt von 952 bp, das mit den Primern <i>fgaFS_for</i> und <i>fgaFS_rev</i> aus cDNA von <i>A. fumigatus</i> B5233 amplifiziert wurde; 5'- <i>SphI</i> -Schnittstelle; das Plasmid wurde zur Kontrolle des Stoppcodons erstellt und diente als <i>template</i> für pMM002
pMM002	<i>fgaFS</i> (AFUA_2G17970) im pGEM-T Easy; enthält ein PCR-Produkt von 888 bp, das mit den Primern <i>fgaFS_for</i> und <i>fgaFS_rev2</i> aus pMM001 amplifiziert wurde; 5'- <i>SphI</i> - und 3'- <i>BamHI</i> -Schnittstelle
pMM003	<i>fgaFS</i> (AFUA_2G17970) im pQE-70; enthält ein 872 bp <i>SphI</i> - und <i>BamHI</i> -Fragment aus pMM002
pMM004	<i>fgaOx3</i> (AFUA_2G17960) im pGEM-T Easy; enthält ein PCR-Produkt von 1183 bp, das mit den Primern <i>fgaOx3_for</i> und <i>fgaOx3_rev</i> aus cDNA von <i>A. fumigatus</i> B5233 amplifiziert wurde; 5'- <i>SphI</i> -Schnittstelle
pMM005	<i>ftmO</i> (AFUA_8G00260) im pYES2/NT C; enthält ein 2055 bp <i>BamHI</i> - und <i>XhoI</i> -Fragment aus pMM004
pMM006	<i>ftmO</i> (AFUA_8G00260) im pGEM-T Easy; enthält ein PCR-Produkt von 2053 bp, das mit den Primern <i>ftmO_for</i> und <i>ftmO_rev</i> aus pAG29 amplifiziert wurde; 5'- <i>NcoI</i> - und 3'- <i>BamHI</i> -Schnittstelle
pMM007	<i>ftmO</i> (AFUA_8G00260) im pQE-60; enthält ein 2042 bp <i>NcoI</i> - und <i>BamHI</i> -Fragment aus pMM006
pMM009	<i>fgaOx1_1-1022</i> im pJexpress411; enthält ein DNA-Fragment von 1077 bp aus chemischer Synthese; 5'- <i>NcoI</i> -, interne 3'- <i>BspMII</i> - und 3'- <i>BamHI</i> -Schnittstelle
pMM010	<i>fgaOx1_1023-1887</i> im pGEM-T Easy; enthält ein PCR-Produkt von 887 bp, das mit den Primern <i>fgaOx1_for2</i> und <i>fgaOx1_rev2</i> aus cDNA von <i>A. fumigatus</i> B5233 amplifiziert wurde; 5'- <i>BspMII</i> - (intern) und 3'- <i>BamHI</i> -Schnittstelle
pMM011	<i>fgaOx1_1-1887</i> (AFUA_2G18050) im pJexpress411; geht aus pMM009 hervor, es wurde ein 863 bp DNA-Fragment aus pMM010, über die <i>BspMII</i> - (intern) und <i>BamHI</i> -Schnittstelle einkloniert; Länge des Gesamt-DNA-Fragments 1923 bp
pMM012	<i>fgaOx1_1-1887</i> (AFUA_2G18050) im pQE-60; enthält ein 1886 bp <i>NcoI</i> - und <i>BamHI</i> -Fragment aus pMM011
pMM013	<i>fgaOx1_1-1887</i> (AFUA_2G18050) im pJexpress411; geht aus pMM012 hervor, wobei ein 18 bp DNA-Fragment, hinter die 3'- <i>BamHI</i> -Schnittstelle einkloniert wurde, das ein Stoppcodon enthält; Länge des Gesamt-DNA-Fragments 1941 bp
pMM014	<i>fgaOx1_1-958</i> im pGEM-T Easy; enthält ein PCR-Produkt von 1049 bp, dass mit den Primern <i>fgaOx1_for3</i> und <i>fgaOx1_rev3</i> aus pMM009 amplifiziert wurde; 5'- <i>EcoRI</i> - und 3'- <i>Eco72I</i> - (intern) und 3'- <i>XhoI</i> -Schnittstelle
pMM015	<i>fgaOx1_1-1887</i> (AFUA_2G18050) im pGEM-T Easy; geht aus pMM014 hervor, wobei ein 936 bp DNA-Fragment aus pMM013, über die intern <i>Eco72I</i> und <i>XhoI</i> -Schnittstelle einkloniert wurde; Länge des Gesamt-DNA-Fragments 1909 bp

Plasmid	Beschreibung
pMM016	<i>fgaOx1_1-1887</i> (AFUA_2G18050) im pYES2/NT C; enthält ein 1920 bp DNA-Fragment aus pMM015, das über zwei <i>EcoRI</i> -Schnittstellen inkloniert wurde
pMM017	<i>fgaOx1_1-1022</i> (AFUA_2G18050) im pGEM-T Easy; enthält ein PCR-Produkt von 1037 bp, das mit den Primern <i>fgaOx1_for</i> und <i>fgaOx1_rev4</i> aus cDNA von <i>A. fumigatus</i> B5233 amplifiziert wurde; 5'- <i>NcoI</i> - und 3'- <i>BspMII</i> -Schnittstelle
pMM018	<i>fgaOx1Δ1-402</i> im pGEM-T Easy; enthält ein PCR-Produkt von 1502 bp, das mit den Primern <i>fgaOx1_for4</i> und <i>fgaOx1_rev</i> aus cDNA von <i>A. fumigatus</i> B5233 amplifiziert wurde; 5'- <i>NcoI</i> - und 3'- <i>BamHI</i> -Schnittstelle
pMM019	<i>fgaOx1Δ1-402</i> im pQE-60; enthält ein 1487 bp <i>NcoI</i> - und <i>BamHI</i> -Fragment aus pMM018
pMM020	<i>easE</i> (AJ011965) aus <i>C. purpurea</i> im pGEM-T Easy; enthält ein PCR-Produkt von 1458 bp, das mit den Primern <i>easE_for</i> und <i>easE_rev</i> aus cDNA von <i>C. purpurea</i> P1 amplifiziert wurde; 5'- <i>NcoI</i> - und 3'- <i>BglII</i> -Schnittstelle
pMM021	<i>easE</i> (AJ011965) aus <i>C. purpurea</i> im pQE-60; enthält ein 1109 bp <i>NcoI</i> - und <i>BglII</i> -Fragment aus pMM020
pMM043	<i>easG</i> (AY836771) aus <i>C. purpurea</i> P1 im pCR2.1; enthält ein DNA-Fragment von 878 bp aus chemischer Synthese; 5'- <i>NcoI</i> - und 3'- <i>BamHI</i> -Schnittstelle
pMM044	<i>easG</i> (AY836771) im pQE-60; enthält ein 872 bp <i>NcoI</i> - und <i>BamHI</i> -Fragment aus pMM043
pMM045	<i>easA</i> (AJ703809) aus <i>C. purpurea</i> P1 im pBluescript II SK (+); enthält ein DNA-Fragment von 1115 bp aus chemischer Synthese; 5'- <i>NcoI</i> - und 3'- <i>BamHI</i> -Schnittstelle
pMM046	<i>easA</i> (AJ703809) im pQE-60; enthält ein 1109 bp <i>NcoI</i> - und <i>BamHI</i> -Fragment aus pMM045
pMM047	<i>fgaFS_{pc}</i> (JQ085282) aus <i>P. commune</i> NRRL2033 im pCR2.1; enthält ein DNA-Fragment von 866 bp aus chemischer Synthese; 5'- <i>NcoI</i> - und 3'- <i>BamHI</i> -Schnittstelle, die Intron-Exon-Struktur, sowie die Gen-Sequenz wurden später durch cDNA-Amplifikation bestätigt (pMM051)
pMM048	<i>fgaFS_{pc}</i> (JQ085282) im pQE-60; enthält ein 860 bp <i>NcoI</i> - und <i>BamHI</i> -Fragment aus pMM047
pMM049	<i>fgaOx3_{pc}</i> (JQ085283) im pGEM-T Easy; enthält ein PCR-Produkt von 1150 bp, das mit den Primern <i>fgaOx3_{pc}_for</i> und <i>fgaOx3_{pc}_rev</i> aus dem Cosmid 28D7 (<i>P. commune</i> NRRL2033) amplifiziert wurde; 5'- <i>SphI</i> - und 3'- <i>BamHI</i> -Schnittstelle
pMM050	<i>fgaOx3_{pc}</i> (JQ085283) im pQE-70; enthält ein 1139 bp <i>SphI</i> - und <i>BamHI</i> -Fragment aus pMM049
pMM051	<i>fgaFS_{pc}</i> (JQ085282) im pGEM-T Easy; enthält ein PCR-Produkt von 871 bp, das mit den Primern <i>fgaFS_{pc}_for</i> und <i>fgaFS_{pc}_rev</i> aus cDNA von <i>P. commune</i> NRRL2033 amplifiziert wurde; 5'- <i>SphI</i> - und 3'- <i>BamHI</i> -Schnittstelle

Tab. 2-9: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Die eingefügten Restriktionsschnittstellen wurden unterstrichen, wobei die fettgedruckten Basen Mutationen in den Genen erzeugten.

Primer	Sequenz (5'→3')	Plasmid
<i>fgaDH_for</i>	<u>ACCATGGC</u> ATCAGTCGAATCCC	pCW01
<i>fgaDH_rev2</i>	CCACTTGGAT TCCC GGCATGC	pCW01
<i>fgaOx3_for</i>	<u>GGCATGCG</u> GAGAAGAACCGTCC	pMM004, pCW02
<i>fgaOx3_rev</i>	CCATAAAACCTTTTCACTGTGCAC	pMM004
<i>fgaOx3_rev2</i>	TTCTCGGGAT TCCG ACGGGGA	pCW02
<i>fgaFS_for</i>	<u>CGCATGC</u> CT ATCCTCGTGCTG	pMM001, pMM002
<i>fgaFS_rev</i>	GGAAGTTGTTATGTTGAAGGCGTC	pMM001
<i>fgaFS_rev2</i>	CCAAAATAGGAT CC ATGCCGCAT	pMM002
<i>fgaOx1_for</i>	<u>CCCATGG</u> CACATCGTATCCTTTG	pMM017
<i>fgaOx1_for2</i>	GTATCAGGGCT TCCGGA ATAACTC	pMM010
<i>fgaOx1_for3</i>	TGAATT CATGTCACATCGTATCC	pMM014
<i>fgaOx1_for4</i>	AT TCCATGG CGCATTCTCCGC	pMM018
<i>fgaOx1_rev</i>	ATGTGCAGCACGACCATCCAG	pMM018
<i>fgaOx1_rev2</i>	CATCTGGGAT TCCG CGGTATAC	pMM010
<i>fgaOx1_rev3</i>	CCTCGAG TTATTCCGGAGC	pMM014
<i>fgaOx1_rev4</i>	AGTTAT TCCGGAG CCCTGATAC	pMM017
<i>fgaOx1_Stopp</i>	<u>GATCCTGACTCGAG</u> TCAG	pMM013
<i>easE_for</i>	<u>CCATGGAGCGGCG</u> CAATCAATTT	pMM020
<i>easE_rev</i>	<u>AGATCT</u> CATTCCGATAAGACTGGACGCT	pMM020
<i>ftmO_for</i>	CACCATGGGTCGCTGGTGGGG	pMM006
<i>ftmO_rev</i>	TCGGAT CT TGGAGGCGCGTCAC	pMM006
<i>fgaOx3_{pc}_for</i>	TGGCATGCCAAAAACCACCCA	pMM049
<i>fgaOx3_{pc}_rev</i>	AC GGATCC CGTTCCTCGAC	pMM049
<i>fgaFS_{pc}_for</i>	CAGCATGCCTATCTTTGTACTGGGTG	pMM051
<i>fgaFS_{pc}_rev</i>	CT GGATCC AGCCCAGTGGTGCTT	pMM051

2.1.5 Kultivierungsbedingungen und Nährmedien

Die zur Herstellung der Nährmedien benötigten Bestandteile wurden hauptsächlich von der Firma AppliChem (Darmstadt) bezogen. Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medien 1,5 % Agar zugegeben. Die autoklavierten Medien wurden bei 4 °C gelagert. Die jeweils benötigten Antibiotika (Tab. 2-12) wurden vor der Verwendung der Medien steril zugegeben.

2.1.5.1 Kultivierungsbedingungen und Nährmedien für *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37 °C in LB-Flüssigmedium (Tab. 2-10) bzw. auf LB-Agarplatten oder in TB-Flüssigmedium (Tab. 2-11). Zur Selektion wurden den Medien verschiedene Antibiotika zugesetzt (Tab. 2-12). Die Flüssigkulturen wurden bei 220 rpm unter Schütteln inkubiert. In einigen Fällen wurden die Zellen zur Verbesserung der Expressionsbedingungen bei 26 °C bzw. 22 °C kultiviert (Kap. 3.2).

Tab. 2-10: LB-Medium.

Substanz	Menge für 1000 ml
Trypton	10 g
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g

Tab. 2-11: TB-Medium.

Substanz	Menge für 900 ml
Trypton	12 g
Hefeextrakt	24 g
Glycerin (99,5 %)	4 ml
Nach dem Autoklavieren werden 100 ml des Kaliumphosphat-Puffers (Tab. 2-31) zugefügt.	

Tab. 2-12: Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung [mg/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml]
Carbenicillin	50	50
Chloramphenicol	50	12,5
Kanamycin	50	25
Tetrazyklin	12,5	12,5
Das Kanamycin wurde in Ethanol, alle anderen Antibiotika wurden in bidest. Wasser gelöst und steril filtriert.		

2.1.5.2 Kultivierungsbedingungen für *S. cerevisiae*

Der Wildtypstamm von *S. cerevisiae* wurde auf YPD-Vollmedium (Tab. 2-13) bzw. auf YPD-Agarplatten (enthielten 1,5 % Agarose) bei 30 °C kultiviert. Nach der Transformation (Kap. 2.3.7.2) erfolgte die Kultivierung bei 30 °C in dem Selektionsmedium (SC-Medium) bzw. auf SC-Agarplatten (enthielten 1,5 % Agarose). Das SC-Medium wurde nach Herstellerangaben des pYES2/NT C Vektors (Invitrogen) angesetzt.

Tab. 2-13: YPD-Vollmedium.

Substanz	Menge für 500 ml
Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Das Medium wurde auf 450 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt und nach dem Autoklavieren 50 ml einer steril filtrierten 20 %igen Glukose-Lösung zugegeben.	

2.1.5.3 Kultivierungsbedingungen für *P. commune* und *C. purpurea*

Für die Isolierung von mRNA (Kap. 2.3.1) aus *P. commune* NRRL2033 und *C. purpurea* P1 erfolgte die Kultivierung beider Pilze in HA-Medium (Tab. 2-14) bei 26 °C als Standkultur.

Tab. 2-14: HA-Medium.

Substanz	Menge für 500 ml
Malz	10 g
Hefeextrakt	4 g
Glukose	4 g

2.1.6 Puffer und Lösungen

2.1.6.1 Lösungen zur DNA-Isolierung

Tab. 2-15: Miniprep Lösung I.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 100 ml
Tris-Base	50 mM	610 mg
EDTA	10 mM	370 mg
Der pH-Wert wurde mit konz. HCl auf pH 8,0 eingestellt und vor dem Gebrauch 100 µg/ml RNase zugeben.		

Tab. 2-16: Miniprep Lösung II.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 50 ml
NaOH	0,2 M	0,4 g
SDS (10 %)	1 % (w/v)	5 ml

Tab. 2-17: Miniprep Lösung III.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 100 ml
Kaliumacetat	3 M	29,5 g
Der pH-Wert wurde mit konz. HCl auf pH 5,4 eingestellt.		

2.1.6.2 Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese

Tab. 2-18: 6 × DNA-Ladepuffer.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 10 ml
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)	25 mg
Glycerin	30 % (v/v)	3 ml

Tab. 2-19: 50 × TAE-Puffer.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 1000 ml
Tris-Base	2 M	242 g
Essigsäure (96 %)	6 % (v/v)	57,1 ml
EDTA (0,5 M)	50 mM	100 ml
Als Arbeitskonzentration wurde mit H ₂ O auf 1 × TAE verdünnt		

2.1.6.3 Puffer zur Proteinaufreinigung

Tab. 2-20: Lysepuffer für die Proteinaufreinigung.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 1000 ml
NaH ₂ PO ₄	50 mM	6,9 g
NaCl	300 mM	17,5 g
Imidazol	10 mM	680 mg
Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,0 eingestellt.		

Tab. 2-21: Waschpuffer für die Proteinaufreinigung.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 1000 ml
NaH ₂ PO ₄	50 mM	6,9 g
NaCl	300 mM	17,5 g
Imidazol	20 mM	1360 mg
Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,0 eingestellt.		

Tab. 2-22: Elutionspuffer für die Proteinaufreinigung.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 1000 ml
NaH ₂ PO ₄	50 mM	6,9 g
NaCl	300 mM	17,5 g
Imidazol	250 mM	17 g
Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,0 eingestellt.		

Tab. 2-23: Proteinlagerungspuffer für die Proteinaufreinigung.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 1000 ml
Tris-HCl pH 7,5 (0,5 M)	50 mM	100 ml
Glycerin	15 % (w/v)	150 ml

2.1.6.4 Puffer für die Größenausschlusschromatographie

Tab. 2-24: Puffer für die Kalibrierung der Größenausschlusschromatographie-Säulen und für die Bestimmung der nativen Molekulargewichte der aufgereinigten Proteine.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 1000 ml
Tris-HCl pH 7,5 (0,5 M)	50 mM	100 ml
NaCl (5 M)	150 mM	30 ml

Tab. 2-25: Kristallisationspuffer zur Aufreinigung von FtmPT1 für die Kristallisation.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 1000 ml
Tris-HCl pH 7,5 (0,5 M)	25 mM	50 ml

2.1.6.5 Puffer und Lösungen zur SDS-PAGE und Nachweis von Proteinen

Tab. 2-26: 5 × Bradfordreagenz.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 200 ml
Serva Blau G in 50 ml Ethanol	0,35 mg/ml	70 mg
Phosphorsäure (85 %)	50 % (v/v)	118 ml

Tab. 2-27: 5 × SDS-Ladepuffer.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 10 ml
Tris-HCl pH 6,8 (1 M)	250 mM	2,5 ml
DTT	500 mM	772 mg
SDS	10 % (w/v)	1 g
Bromphenolblau	0,5 % (w/v)	50 mg
Glycerin	50 % (v/v)	5 ml

Tab. 2-28: 10 × SDS-Laufpuffer.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 500 ml
Tris-Base	250 mM	15,2 g
Glycin	1,92 M	72 g
SDS	1 % (w/v)	5 g

Tab. 2-29: Coomassie-Färbelösung.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 1000 ml
Coomassie Brilliant Blau G-250	0,1 % (w/v)	1 g
Essigsäure	10 % (v/v)	100 ml
Methanol	50 % (v/v)	500 ml

Tab. 2-30: Entfärberlösung.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 500 ml
Ethanol	20 %	100 ml
Essigsäure	10 %	50 ml

2.1.6.6 Sonstige Puffer und Lösungen

Tab. 2-31: Kaliumphosphat-Puffer für das TB-Medium.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 1000 ml
KH ₂ PO ₄	0,17 M	23,2 g
K ₂ HPO ₄	0,72 M	17,5 g

Tab. 2-32: van Urk-Reagenz zum Besprühen von Dünnschichtchromatographie-Platten.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 100 ml
Dimethylaminobenzaldehyd	0,8 mM	125 mg
Eisen(III)Chlorid	0,1 mg/ml	10 mg
Schwefelsäure	50 mM	65 ml
Wasser	0,1 mg/ml	35 ml

2.2 Bioinformatische Analysen

Die Tab. 2-33 listet die aktuellen Internet-Adressen der verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten Programme auf. Dabei wurde für direkte DNA- und Proteinsequenzvergleiche sowie für Homologievergleiche von Proteinsequenzen mit der NCBI-Datenbank das Programm „BLAST 2 SEQUENCES“ verwendet. Zur Identifizierung der putativen Ergotalkaloidgencluster innerhalb der Ascomyceten wurde das Programm „genomic BLAST“ benutzt.

Tab. 2-33: Internet-Adressen der verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten Programme.

Programm	Website
BLAST 2 SEQUENCES	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
genomic BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
DNASIS	http://www.miraibio.com/dnasis-max/dnasis-max-overview.html
ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
ESPrict 2.2	http://esprict.ibcp.fr/
Tree View 1.6.6	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html
TMHMM Server v. 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
TMpred	http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html
GENEius	www.genius.de

Die Sequenzidentitäten der direkten Proteinsequenzvergleiche wurden mit dem Programm „DNASIS“ berechnet. Für die Multi-Proteinsequenzvergleiche wurde das Programm „ClustalW2“ und zur Visualisierung streng konservierter Aminosäuren das Programm „ESPrpt 2.2“ genutzt. Zur Erstellung der phylogenetischen Stammbäume wurde ebenfalls „ClustalW2“ verwendet. Die Visualisierung erfolgte durch „Tree View 1.6.6“. Die Membrandomänen-Vorhersagen für FgaOx1 erfolgten mit den Programmen „TMHMM Server v. 2.0“ und „TMPred“ (Hofmann & Stoffel 1993). Die Codon-Optimierungen zur Expression der Gene *easG*, *easA* und *fgaFS_{pc}* in *E. coli* wurden mit dem Programm „GENEius“ durchgeführt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von RNA aus Pilzen und Herstellung von cDNA

Das Mycel für die Isolierung der RNA von *P. commune* NRRL2033 und *C. purpurea* P1 wurde aus einer 250 ml Standkultur (HA-Medium, Tab. 2-14), die bei 26 °C für 4 bis 5 Tage kultiviert wurde, gewonnen. Das Mycel wurde in 50 ml Reaktionsgefäßen bei 6000 × g und 4 °C für 10 min pelletiert und anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Im nächsten Arbeitsschritt wurde das Mycel unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerrieben und schließlich 75 mg Mycel in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der RNA erfolgte dann mit Hilfe des E. Z. N. A. Fungal RNA Miniprep Kits (Omega Bio-Tek) nach dem Protokoll des Herstellers. Wie vom Hersteller vorgeschlagen, wurde zur Reduzierung von gDNA Rückständen ein Verdau mit DNase I während der Aufreinigung durchgeführt. Am Ende wurde die RNA mit zweimal 50 µl H₂O eluiert. Zur cDNA-Synthese wurde das ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB) genutzt. Für den Ansatz wurden 6 µl der zuvor isolierten Gesamt-RNA eingesetzt und nach dem Protokoll des Herstellers inkubiert. Als Primer wurden die Oligo d(T)₂₃ VN des Herstellers verwendet.

2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Alkalische Lyse)

Alle Plasmid-Isolierungen dieser Arbeit wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt. Aus einer 5 ml Übernachtskultur wurden 2 ml der Bakterienkultur entnommen und die Zellen bei 10000 rpm für 4 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 250 µl der Miniprep Lösung I (Tab. 2-15) resuspendiert. Es wurden 250 µl der Miniprep Lösung II zugegeben (Tab. 2-16), der Ansatz fünfmal invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden 270 µl der Miniprep Lösung III (Tab. 2-17) zugegeben, die Lösung durch fünfmaliges Invertieren gemischt und der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13300 rpm, danach wurde der lösliche Überstand abgenommen und mit 750 µl eiskaltem 2-Propanol gefällt. Nach mehrmaligem Invertieren wurde bei 13300 rpm für 30 min zentrifugiert, das 2-Propanol abgenommen und das entstandene DNA-

Pellet mit 700 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für 10 min bei 65 °C getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen.

2.3.3 Restriktion von Plasmid-DNA

Die Tab. 2-34 gibt den Standardansatz für alle durchgeführten Restriktionen von Plasmid-DNA wieder. Für die durchgeführten Umklonierungen wurde jeweils ein Vielfaches des Standardansatzes verwendet.

Tab. 2-34: Standardansatz für die Restriktionen.

Substanz	Endkonzentration	Menge für 10 µl
Plasmid-DNA	ca. 20 ng/µl	0,5 µl
Jena BioScience-Puffer	1 ×	1 µl
Enzym	0,25 U/µl	0,25 µl
H ₂ O	-	8,25 µl
Inkubation für 1 h bei 37 °C		

2.3.3.1 Partielle Restriktion von Plasmid-DNA

Die Plasmide pMM002 (*fgaFS*) und pMM006 (*ftmO*) wurden über eine partielle Restriktion verdaut, da die Gensequenz *fgaFS* eine interne *Bam*HI- (Abb. 3-11) und die von *ftmO* eine interne *Nco*I-Schnittstelle (Abb. 3-6) enthielt. Daher wurden beide Plasmide zunächst mit dem Enzym, das nur einmal in dem Plasmid schneidet, für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Plasmide mit dem zweiten Enzym, von dem nur ein Zehntel (0,025 U/µl) der Standardmenge verwendet wurde, für 2 min bei 37 °C inkubiert. Nach den 2 Minuten erfolgten die Zugabe des 6 × DNA-Ladepuffers und die Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.3.4) zum Abstoppen des Restriktionsverdaus. Unter diesen Bedingungen konnte das jeweilige benötigte Gesamt-DNA-Fragment, in dem beide Enzyme nur einmal geschnitten haben, aus dem Agarosegel isoliert werden (Kap. 2.3.4.1).

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurden horizontale Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Dabei wurden je nach gewünschtem Trennbereich Agarosegele mit 0,8 bis 1,5 % Agaroseanteil verwendet. Die Agarose wurde in 1 × TAE-Puffer (Tab. 2-19) gelöst und mit 1 × SYBR Safe DNA Gel stain (Invitrogen) versetzt. Als Laufmittel diente ebenfalls der 1 × TAE-Puffer. Die Trennung erfolgte mit einer Arbeitsspannung von 120 V unter Verwendung der Compact-Midi (MBT 30 EL) Elektrophoresekammer der Firma Micro-Bio-Tec-Brand. Die Proben wurden mit dem 6 × DNA-Ladepuffer (Tab. 2-18) unter Verdünnung des Ladepuffers auf 1 × gemischt, damit die Beladung des Gels erfolgen konnte. Als Größenstandard diente der GeneRuler DNA Ladder Mix der Firma Fermentas. Da der SYBR

Safe DNA Gel stain Farbstoff DNA-interkalierend ist, konnte die Detektion der Proben mittels UV-Licht erfolgen und mit der Kamera Olympus SP-500 UZ fotografiert werden.

2.3.4.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der jeweiligen Proben mittels Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.3.4), wurden die linearen DNA-Fragmente unter UV-Licht identifiziert und mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die DNA wurden im nächsten Schritt mittels des HiYield PCR Clean-up and Gel-Extraction Kit (Tab. 2-3) nach dem Hersteller Protokoll aus dem Agarose-Gel isoliert und aufgereinigt. Die Elution der DNA-Fragmente erfolgte mit Wasser.

2.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation der PCR-Produkte in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy wurde der in Tab. 2-35 abgebildete Standardansatz verwendet. Die Menge des eingesetzten pGEM-T Easy Vektors wurde im Vergleich zur Herstellerangabe um die Hälfte reduziert. Die Reduzierung der eingesetzten Vektormenge erfolgte, um in den Ligationsansätzen ein Vektor zu PCR-Produkt-Verhältnis von 1:1 zu erreichen. Die PCR-Produkte wurden vor der Ligation über eine Isolierung mittels Gelextraktion aufgereinigt (Kap. 2.3.4.1). Für die Umklonierung der DNA-Fragmente aus den Klonierungsvektoren in die Expressionsvektoren wurden sowohl der Zielvektor als auch der Klonierungsvektor zunächst mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen verdaut und die Proben mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mittels Gelextraktion. Der Vektor und das Insert wurden direkt über eine Säule aufgereinigt und in 20 µl Wasser eluiert. Dem Elutionsansatz wurden dann die weiteren Komponenten des Ligationsansatzes aus Tab. 2-36 zugefügt.

Tab. 2-35: Standardansatz für die Ligation der PCR-Produkte in pGEM-T Easy.

Substanz	Menge für 10 µl
PCR-Produkt nach Gelextraktion	3,5 µl (ca. 25 ng)
Rapid Ligation Buffer (2 ×)	5 µl
pGEM-T Easy Vektor (25 ng)	0,5 µl
T4 DNA Ligase (Promega)	1 µl
H ₂ O	-

Tab. 2-36: Standardansatz für die Ligation von Vektoren und Inserts.

Substanz	Menge für 24 µl
Vektor und Insert nach Gelextraktion	20 µl
T4 DNA Ligase Puffer (10 ×)	2,4 µl
T4 DNA Ligase (Jena BioScience)	1 µl
H ₂ O	0,6 µl

2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der DNA-Produkte aus Tab. 2-37 erfolgte mittels *Polymerase chain reaction* (PCR). Zur Bestimmung der jeweiligen, optimalen Primer-Anlagerungstemperatur wurde zunächst eine Gradienten-PCR mit Hilfe des Eppendorf Mastercycler Gradient durchgeführt. Die Tab. 2-38 gibt den Standardansatz für eine einzelne PCR-Reaktion innerhalb des Gradienten an. Die Tab. 2-39 enthält das zugehörige PCR-Gradienten-Programm.

Tab. 2-37: Übersicht über die genspezifischen PCR-Bedingungen.

PCR-Produkt mit Plasmid-Bezeichnung	Verwendete Primer	Primer-Anlag.-temperatur	Synthesezeit
<i>ftmO</i> (pMM006)	<i>ftmO_for/ftmO_rev</i>	70,0 °C	120 sek
<i>fgaDH</i> (pCW01)	<i>fgaDH_for/fgaDH_rev2</i>	51,5 °C	60 sek
<i>fgaFS</i> (pMM001)	<i>fgaFS_for/fgaFS_rev</i>	62,9 °C	60 sek
<i>fgaFS</i> (pMM002)	<i>fgaFS_for/fgaFS_rev2</i>	52,1 °C	60 sek
<i>fgaOx3</i> (pMM004)	<i>fgaOx3_for/fgaOx3_rev</i>	57,5 °C	90 sek
<i>fgaOx1</i> (pMM010)	<i>fgaOx1_for2/fgaOx1_rev2</i>	50,0 °C	60 sek
<i>fgaOx1</i> (pMM014)	<i>fgaOx1_for3/fgaOx1_rev3</i>	57,9 °C	60 sek
<i>fgaOx1</i> (pMM017)	<i>fgaOx1_for/fgaOx1_rev4</i>	63,0 °C	60 sek
<i>fgaOx1</i> (pMM018)	<i>fgaOx1_for4/fgaOx1_rev</i>	57,9 °C	90 sek
<i>easE</i> (pMM020)	<i>easE_for/easE_rev</i>	64,0 °C	90 sek
<i>fgaOx3_{pc}</i> (pMM049)	<i>fgaOx3_{pc}_for/fgaOx3_{pc}_rev</i>	57,9 °C	90 sek
<i>fgaFS_{pc}</i> (pMM051)	<i>fgaFS_{pc}_for/fgaFS_{pc}_rev</i>	54,3 °C	60 sek

Tab. 2-38: Standardansatz (15 µl) für eine einzelne Reaktion im PCR-Gradient.

Substanz	Endkonzentration
cDNA bzw. Plasmid-DNA	3 nmol/µl
Primer for (10 pmol/µl)	0,2 pmol/µl
Primer rev (10 pmol/µl)	0,2 pmol/µl
dNTPs (2,5 mM pro Nukleotid)	200 µM (pro Nukleotid)
<i>High Fidelity</i> -Puffer (5 ×)	1 ×
<i>High Fidelity</i> -Polymerase	0,05 U/µl
H ₂ O	

Tab. 2-39: PCR-Gradienten-Programm.

Temperatur	Dauer	Zyklen	Funktion
94 °C	2 min	1	Heißstart
94 °C	15 sek	25	Denaturierung
48 °C - 64 °C	1 min	25	Primer-Anlagerung
72 °C	variabel (Tab. 2-37)	25	Synthese
72 °C	7 min	1	Finale Synthese
4 °C	∞		Endtemperatur

2.3.7 Herstellung kompetenter Zellen

2.3.7.1 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Im ersten Schritt zur Herstellung der kompetenten *E. coli*-Zellen wurden 4 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (je nach *E. coli*-Stamm) versetzt und diese aus einer Glycerin-Dauerkultur angeimpft. Die Inkubation der Zellen erfolgte über Nacht bei 37 °C und 220 rpm. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) mit 2 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,6 kultiviert und direkt in zwei 50 ml Reaktionsgefäßen bei $6000 \times g$ und 4 °C für 10 min pelletiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Es folgte die Resuspendierung der Pellets in 25 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung. Die Suspensionen wurden vereint und nach erneuter Zentrifugation ($6000 \times g$, 4 °C für 10 min) wieder in 50 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis wurden die Zellen pelletiert ($6000 \times g$, 4 °C für 10 min) und in 3 ml 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 100 µl Aliquots erstellt, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

Die Tab. 2-40 gibt das Protokoll wieder, das verwendet wurde, um die kompetenten *E. coli*-Zellen mit den Plasmiden zu transformieren.

Tab. 2-40: Protokoll für die Transformation der kompetenten Zellen mit den Plasmiden.

Arbeitsschritt	Dauer
Auftauen der <i>E. coli</i> -Zellen (100 µl Aliquot) auf Eis	15 min
Zugabe von 0,5 µl des Plasmids bzw. 24 µl eines Ligationsansatzes und Lagerung auf Eis	30 min
Hitzeschock bei 42 °C	50 s
Lagerung der Zellen auf Eis	1 min
Zugabe von 400 µl LB-Medium	-
Inkubation der Zellen bei 37 °C	45 min
Pelletieren der Zellen und Entfernen des Mediums	-
Resuspendieren der Zellen in 100 µl Medium und Ausplattierung	Inkubation über Nacht bei 37 °C

Der pGEM-T Easy enthält das *lacZ*-Gen, das eine Blau-Weiß Selektion ermöglicht. Um diese Selektion nutzen zu können, wurden die LB-Agar-Platten mit einer Lösung aus 40 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal) (20 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid (DMF)), 7 µl Isopropyl- β -D-thiogalaktosid-Lösung (IPTG-Lösung) (1 M) und 153 µl sterilfiltriertem Wasser bestrichen. Das DMF musste vor dem Ausplattieren der Zellen auf Grund seiner toxischen Eigenschaften durch Abdampfen wieder entfernt werden.

2.3.7.2 Herstellung und Transformation kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen und die Transformation mit den jeweiligen Plasmiden erfolgte mit dem *S. c.* EasyCompTM Transformation Kit nach Herstellerangaben. Dazu wurden zunächst 10 ml YPD-Vollmedium (Kap. 2.1.5.2 Tab. 2-13) aus einer einzelnen Kolonie von einer YPD-Platte des *S. cerevisiae* INVSc1-Stammes angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 ml YPD-Vollmedium mit der Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,4 angeimpft und bei 30 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 inkubiert. Die Zellen wurden bei 500 × g und 22 °C für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 10 ml der Lösung I des Kits resuspendiert und erneut bei 500 × g und 22 °C für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml der Lösung II des Kits resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 50 µl Aliquots erstellt, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

Zur Transformation wurde ein 50 µl Aliquot der Zellen auf Eis aufgetaut und 1 µl der jeweiligen Plasmid-DNA zugegeben. Anschließend wurden 500 µl der Lösung III des Kits zu dem Ansatz gegeben und das Reaktionsgefäß durch Anstoßen durchmischt. Der Ansatz wurde dann für eine Stunde bei 30 °C inkubiert und alle 15 min erneut durchmischt. Nach der einstündigen Inkubation wurden die Zellen bei 3000 × g und 22 °C für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 100 µl der Lösung III des Kits resuspendiert auf zwei SC-Agar-Platten verteilt und für zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.3.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode (Sanger & Coulson 1975) von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurde die zu sequenzierende Plasmid-DNA auf 100 ng/µl mit steril filtriertem, bidestilliertem Wasser verdünnt und 1 µg der Plasmid-DNA pro Sequenzierungsreaktion eingeschickt.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Genexpression und Zellaufschluss

2.4.1.1 Genexpression in *E. coli* und Zellaufschluss

Eine 100 ml LB-Vorkultur wurde mit dem benötigten Antibiotikum versetzt und aus einer Glycerin-Dauerkultur angeimpft. Nach dem Animpfen des Mediums wurde die Vorkultur bei 37 °C und 220 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1000 ml Medium mit 20 ml der Vorkultur versetzt und bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 bis 0,7 wurde die Genexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte bei 220 rpm mit unterschiedlichen Temperaturen und Zeiten je nach Expressionsplasmid

(Kap. 3.2). Im Anschluss wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 8 min bei 4500 rpm und 4 °C vom Medium getrennt. Die pelletierten Bakterien wurden in 2 ml Lysepuffer pro g Zellmasse (Tab. 2-20) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zunächst mit Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Lyse durch Ultraschall mit 6 Zyklen für je 10 s bei 200 bis 300 W (Branson Sonifier 250) und 4 °C durchgeführt wurde. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C. Anschließend wurde der Überstand (lösliche Proteinanteile) von den pelletierten, unlöslichen Bestandteilen getrennt. Das überproduzierte Protein wurde anschließend aus dem Lysat mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (Kap. 2.4.2).

2.4.1.2 Genexpression in *S. cerevisiae* und Zellaufschluss

Nach der Transformation von *S. cerevisiae* mit dem jeweiligen Plasmid wurden die Zellen auf SC-Platten ausgestrichen und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Aus einer einzelnen Kolonie wurden dann 100 ml SC-Medium-Vorkultur angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. In dem SC-Medium diente Glukose als Kohlenstoffquelle. Nach 36 bis 48 Stunden musste eine Trübung der Vorkultur erfolgen, ansonsten wurde der Klon als negativ verworfen. Nach Eintritt der Trübung wurde eine 2 l Hauptkultur mit 50 ml der Vorkultur angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert. Die Zellen wurden bei 4000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert und im Anschluss mit 500 ml glukosefreiem SC-Medium resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C für 5 min. Das Pellet wurde in 100 ml SC-Medium resuspendiert und jeweils 1000 ml SC-Induktionsmedium mit 25 ml der Kultur angeimpft. Das SC-Induktionsmedium enthielt 2 % Galaktose zur Induktion und 2 % Raffinose als Kohlenstoffquelle. Die Zellen wurden bei 30 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation für 8 min bei 4500 rpm und 4 °C vom Medium getrennt. Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml Lysepuffer pro g Zellmasse (Tab. 2-20) resuspendiert und direkt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die tiefgefrorenen Zellen wurden mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerrieben und das Lysat auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C. Anschließend wurde der Überstand (lösliche Proteinanteile) von den pelletierten, unlöslichen Bestandteilen getrennt. Das überproduzierte Protein wurde anschließend aus dem Lysat mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (Kap. 2.4.2).

2.4.2 Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose bzw. Kobalt-Resin

Das Lysat aus *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* wurde mit einer definierten Menge Ni-NTA-Agarose bzw. Kobalt-Resin versetzt und für 1 Stunde bei 4 °C durchmischt. Die jeweilige Menge an Ni-NTA-Agarose bzw. Kobalt-Resin wurde experimentell für jedes aufzureinigende Protein bestimmt. Die Lysat-Ni-NTA-Agarose- bzw. -Kobalt-Resin-Mischung wurde dann in eine 8 ml Säulenhülse mit Fritte gegeben und der Durchlauf verworfen. Es folgte das zweimalige

Waschen der Protein-Ni-NTA-Agarose- bzw. Co-Resin-Mischung mit 8 ml des Waschpuffers (Tab. 2-21) und die Elution der Proteine durch die viermalige Zugabe von 1 ml Elutionspuffer (Tab. 2-22). Als letzter Aufreinigungsschritt wurde eine Umpufferung und Entsalzung der Elutionsfraktionen über eine Sephadex G25 PD-10-Säule durchgeführt. Dabei wurde zunächst die PD-10-Säule mit 40 ml Proteinlagerungspuffer (Tab. 2-23) äquilibriert und anschließend 2,5 ml der Elutionsfraktionen auf die Säule aufgetragen. Nach dem Einsinken der Fraktion wurden 3,5 ml Proteinlagerungspuffer auf die Säule aufgetragen und der Durchfluss aufgefangen. Die gesammelten 3,5 ml wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Während der Aufreinigung wurden von den verschiedenen Aufreinigungsschritten Proben entnommen und diese über eine *Sodium dodecyl sulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Kap. 2.4.5) zur Optimierung der Aufreinigung analysiert.

2.4.3 Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Zur Bestimmung der nativen Molekulargewichte der aufgereinigten, überproduzierten Proteine wurde eine Größenausschlusschromatographie mit der HiLoad 16/60 Superdex 75- bzw. der HiLoad 16/60 Superdex 200-Säule durchgeführt. Beide Säulen wurden über eine ÄKTAprime™ plus Anlage der Firma GE Healthcare (Freiburg) bei 4 °C und einer Flussrate von 1 ml/min betrieben. Die Visualisierung der Absorption bei 280 nm erfolgte mit dem Rekorder LKB Bromma 2210 2-Channel Recorder. Als Fließmittel diente der Kalibrierungspuffer (Tab. 2-24), der vor der Benutzung steril filtriert und entgast wurde. Für die Kalibrierung der Säulen wurde das Gel Filtration HMW and LMW Calibration Kit der Firma GE Healthcare verwendet. Beide Kits enthalten verschiedene globuläre Standardproteine, von denen die exakte Größe bekannt ist. Zur Erstellung der Kalibrierungsgeraden wurde für die HiLoad 16/60 Superdex 75-Säule Conalbumin (75 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) über die Säule aufgetrennt. Für die HiLoad 16/60 Superdex 200-Säule wurden auf Grund des unterschiedlichen Trennbereiches Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumin (75 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carbonanhydrase (29 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa) verwendet. Mit Dextranblau 2000 (2000 kDa) wurde für beide Säulen das Ausschlussvolumen bestimmt.

2.4.3.1 Konzentrierung von Proteinen mittels Ultrafiltration

Zur Aufkonzentrierung von Protein-Lösungen wurden Amicon- (Merck Millipore) bzw. Vivaspin 20-Konzentratoren (Vivaproducts) mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa verwendet. Zunächst wurde die Membran des Konzentrators mit 10 ml des gleichen Puffers wie der der Protein-Lösung bei $3400 \times g$ und 4 °C für 10 min äquilibriert. Anschließend wurden die Protein-Lösungen in den Konzentrator gegeben und bei $3400 \times g$ und 4 °C solange zentri-

fugiert, bis das gewünschte Volumen erhalten worden war. Nach jeweils 5-minütiger Zentrifugation wurde die Protein-Lösung durch Pipettieren durchmischt.

2.4.4 Aufreinigung von FtmPT1 für Kristallisationsversuche

Die Kultivierung und Expression erfolgte in LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6. Es folgte die Induktion mit 0,1 mM IPTG für 16 h bei 30 °C. Die Kultivierungs- und Expressionsbedingungen wurden bereits von Dr. Alexander Grundmann optimiert (Grundmann & Li 2005).

Zur Verbesserung der Reinheit des aufgereinigten FtmPT1 für die Kristallisationsversuche wurde zunächst die Menge an eingesetzter Ni-NTA-Agarose von 220 µl auf 120 µl pro Liter Kultur reduziert. Das Eluat von 4 PD-10-Säulen (14 ml) aus zwei Liter Kultur wurde mit einem Amicon-Konzentrator, welcher eine Membran mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa besaß (Kap. 2.4.3.1), auf 1,5 ml aufkonzentriert. Die gesamten 1,5 ml wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die HiLoad 16/60 Superdex 200 aufgetragen, die zuvor mit drei Säulenvolumen (360 ml) Kristallisationspuffer (Tab. 2-25) äquilibriert wurde. Die ersten 30 ml des Laufs wurden verworfen und anschließend Fraktionen mit einem Volumen von 2 ml gesammelt. Die relevanten Fraktionen wurden nach der Überprüfung mittels SDS-PAGE (Kap. 2.4.5) vereint, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C bis zur Übergabe an Tübingen gelagert.

2.4.5 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli werden zwei Puffersysteme und ein separater Sammel- und Trenngel kombiniert (Laemmli 1970). Beides wirkt sich vorteilhaft auf die SDS-PAGE aus. Die Ionen der beiden Puffer erlangen durch die vorgegebenen pH-Werte unterschiedliche Mobilitäten. Hierbei bilden die Chloridionen auf Grund ihrer Mobilität die Leitonen und die Glycinionen die Folgeionen. Die Proteine wandern zwischen diesen Ionen. Die Ionen erzeugen beim Anlegen der Spannung einen Feldgradienten, durch den ein Stapeleffekt induziert wird. Gelangen die Proteine schließlich ans Trenngel, erfahren sie einen höheren Reibungswiderstand und eine pH-Änderung, wodurch sie sich stauen und von den Folgeionen überholt werden. Ab diesem Zeitpunkt befinden sich die Proteine nicht mehr in einem diskontinuierlichen, sondern einem homogenen System, wodurch sich der Stapel auflöst und sich eine zonenelektrophoretische Auftrennung einstellt.

Die Tab. 2-41 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten 15 %igen SDS-Gele. Die SDS-PAGE wurde mit 80 V für das Sammelgel und mit 120 V für das Trenngel betrieben. Als Laufmittel wurde 1 × SDS-Laufpuffer (Tab. 2-28) verwendet. Die Proteinproben wurden mit dem 5 × SDS-Probenpuffer (Tab. 2-27) im Verhältnis 5:1 gemischt. Nach der erfolgten Trennung der Proteine wurde das Gel für 20 min in die Coomassie-Färbelösung (Kap. 2.1.6.5 Tab.

2-29) gegeben. Das Entfärben des Gels erfolgte für 1 bis 2 Stunden in der Entfärberlösung (Kap. 2.1.6.5 Tab. 2-30), bevor das Gel schließlich in Wasser überführt wurde.

Tab. 2-41: Zusammensetzung der 15 %igen SDS-Gele.

Trenngel 15 %	Menge für 1 Gel	Sammelgel 3,9 %	Menge für 1 Gel
1,5 M Tris pH 8,8	1,3 ml	0,5 M Tris pH 6,8	625 µl
10 % SDS	50 µl	10 % SDS	25 µl
30 % Acrylamid	2,5 ml	30 % Acrylamid	325 µl
TEMED	2,5 µl	TEMED	2,5 µl
10 % APS	125 µl	10 % APS	50 µl
Wasser	1,1 ml	Wasser	1,5 ml

2.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford gewählt (Bradford 1976). Zunächst wurde das 5 × Bradfordreagenz (Tab. 2-26) mit bidest. Wasser auf 1 × verdünnt und über Nacht im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Lösung mehrfach filtriert und anschließend bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für das 1 × Bradfordreagenz wurde eine Kalibrierungsreihe mittels einer 1 mg/ml *bovine serum albumin* (BSA) Lösung erstellt. Aus der BSA-Lösung wurden Verdünnungen von 1 bis 10 µg BSA in je 100 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,5 als Endvolumen angesetzt. Zu den verschiedenen Verdünnungen wurden je 1 ml des 1 × Bradfordreagenz zugegeben und die Absorption bei 595 nm mit einem UV-Spektrometer nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur bestimmt. Für jede Verdünnung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, aus deren Mittelwerten sich die Kalibrierungsreihe ergab. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Proteinprobe zunächst mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 auf ein Endvolumen von 100 µl verdünnt. Schließlich wurde 1 ml 1 × Bradfordreagenz zugegeben und die Absorption bei 595 nm bestimmt. Über die Kalibrierungsreihe konnte die Proteinkonzentration berechnet werden.

2.4.7 Enzymatische Reaktionsansätze

2.4.7.1 Enzymatische Herstellung von DMA-L-Abrin

Zur enzymatischen Herstellung von DMA-L-Abrin, das für die Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von FgaOx1 benötigt wurde (Kap. 3.4), fand der Reaktionsansatz nach Tab. 2-42 Verwendung. Der Ansatz wurde über Nacht bei 30 °C inkubiert und am nächsten Tag mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei 37 °C bis auf ca. 200 µl eingeeengt. Es wurden 200 µl Methanol zugegeben und der Ansatz für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Isolierung von DMA-L-Abrin wurde mittels HPLC durchgeführt (Kap. 2.5.2).

Tab. 2-42: Ansatz zur Isolierung von DMA-L-Abrin.

Zusammensetzung	Endkonzentration	Menge für 5 ml
L-Abrin (20 mM)	1 mM	250 µl
FgaPT2 (2,5 µg/µl)	0,25 µg/µl	500 µl (1,25 mg)
DMAPP (100 mM)	2 mM	100 µl
CaCl ₂ (100 mM)	5 mM	250 µl
Tris-HCl pH 7,5 (50 mM)	50 mM	3,4 ml

2.4.7.2 Enzymatische Herstellung von Chanoclavin-I-Aldehyd

Den Ansatz, der zur enzymatischen Gewinnung von Chanoclavin-I-Aldehyd durchgeführt wurde, gibt die Tab. 2-43 wieder. Das Chanoclavin-I-Aldehyd wurde für die Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von EasG verwendet (Kap. 3.6). Der Ansatz wurde für 4 h bei 30 °C inkubiert und anschließend der pH-Wert durch Zugabe von 3600 µl Natriumhydroxid (1 M) auf 9 eingestellt. Es folgte die zweimalige Extraktion des Ansatzes mit 360 ml Ethylacetat. Die vereinten Ethylacetat-Phasen wurden mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei 37 °C bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 1000 µl Methanol aufgenommen. Je 500 µl der Lösung wurden anschließend auf eine präparative DC-Platten aufgetragen und mittels DC mit einem Fließmittelgemisch aus Chloroform, Methanol und Ammoniumhydroxid (80 : 20 : 0,2) aufgetrennt (Kap. 2.5.1).

Tab. 2-43: Ansatz zur Isolierung von Chanoclavin-I-Aldehyd.

Zusammensetzung	Endkonzentration	Menge für 180 ml
Chanoclavin-I (50 mM)	1 mM	3600 µl
FgaDH (3 µg/µl)	0,1 µg/µl	6 ml (18 mg)
NAD (100 mM)	5 mM	9000 µl
Tris-HCl pH 7,5 (50 mM)	50 mM	161 ml

2.4.7.3 Enzymatische Herstellung von Agroclavin

Das in Kapitel 3.6 mittels *nuclear magnetic resonance* (NMR) untersuchte Agroclavin wurde über den enzymatischen Reaktionsansatz in Tab. 2-44 hergestellt. Inkubiert wurde der Ansatz über Nacht bei 30 °C. Durch Zugabe von 600 µl Natriumhydroxid (1 M) wurde der pH auf 9 eingestellt und durch dreimalige Zugabe von 60 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinten Ethylacetat-Phasen wurden über einen Rotationsverdampfer bei 37 °C bis zur Trockene eingengt, der Rückstand in 300 µl Methanol aufgenommen und mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) isoliert (Kap. 2.5.2).

Tab. 2-44: Ansatz zur Isolierung von Agroclavin.

Zusammensetzung	Endkonzentration	Menge für 30 ml
Chanoclavin-I (50 mM)	1 mM	600 µl
FgaDH (4,8 µg/µl)	0,1 µg/µl	600 µl (3 mg)
EasG (1,7 µg/µl)	0,1 µg/µl	1800 µl (3 mg)
NAD (100 mM)	5 mM	1500 µl
NADPH (100 mM)	5 mM	1500 µl
GSH (50 mM)	10 mM	6000 µl
Tris-HCl pH 7,5 (50 mM)	50 mM	18,0 ml

2.4.7.4 Enzymatische Herstellung von Pyroclavin

Für die enzymatische Herstellung von Pyroclavin (Kap. 3.7) wurde der Ansatz nach Tab. 2-45 verwendet. Im Anschluss an die 5-stündige Inkubation bei 30 °C wurde der Ansatz mit 500 µl Natriumhydroxid (1 M) auf pH 9 eingestellt und dreimal mit je 40 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer bei 37 °C eingeengt und schließlich der verbliebene Rückstand in 1000 µl Methanol aufgenommen. Diese 1000 µl wurden auf drei analytische DC-Platten aufgetragen und mit einem Fließmittelgemisch aus Chloroform, Methanol und Ammoniumhydroxid (80 : 20 : 0,2) aufgetrennt (Kap. 2.5.1).

Tab. 2-45: Ansatz zur Isolierung von Pyroclavin.

Zusammensetzung	Endkonzentration	Menge für 20 ml
Chanoclavin-I (50 mM)	1 mM	400 µl
FgaDH (4,8 µg/µl)	0,1 µg/µl	417 µl (2 mg)
FgaOx3 (1,2 µg/µl)	0,1 µg/µl	1667 µl (2 mg)
EasG (1,0 µg/µl)	0,1 µg/µl	2000 µl (2 mg)
NAD (100 mM)	5 mM	1000 µl
NADH (100 mM)	5 mM	1000 µl
FMN (100 mM)	5 mM	1000 µl
Tris-HCl pH 7,5 (50 mM)	50 mM	12,5 ml

2.5 Analytik niedermolekularer Substanzen

2.5.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Sowohl für die Analyse von enzymatischen Reaktionsansätzen (Kap. 3.7) als auch zur Isolierung des Chanoclavin-I-Aldehyds (Kap. 3.6) und des Pyroclavins (Kap. 3.7) wurde die Dünnschichtchromatographie (DC) genutzt. Für die Analyse der enzymatischen Reaktionsansätze wurden die DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 der Firma Merck verwendet. Dabei erfolgte die Trennung der Substanzen aus den Reaktionsansätzen mit einem Fließmittelgemisch aus Chloroform, Methanol und Ammoniumhydroxid (80 : 20 : 0,2). Die Detektion der Ergotalkaloide erfolgte durch das Besprühen der DC-Folie mit dem van Urk-Reagenz (Tab. 2-32),

gefolgt von einer 1 % (w/v) NaNO_2 -Lösung. Die violetten Verfärbungen konnten im Tageslicht betrachtet werden.

Für die Isolierung des Chanoclavin-I-Aldehyds wurden die präparativen DC-Platten (Aluminiumoxid 60 F254 basisch, Glas) der Firma Merck verwendet. Die Isolierung des Pyroclavins wurde auf Grund der besseren Trennleistung auf drei analytische DC-Platten durchgeführt. Als Fließmittel wurde bei beiden Isolierungen das Gemisch aus Chloroform, Methanol und Ammoniumhydroxid (80 : 20 : 0,2) genutzt. Die Detektion der Substanzen erfolgte mittels UV-Licht. Nachdem an den entsprechenden Bereichen das Kieselgel-Material abgelöst war, wurde das Kieselgel-Material mit Methanol extrahiert und die Überstände am Rotationsverdampfer bei 37 °C eingengt. Das Chanoclavin-I-Aldehyd wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und mittels HPLC-Analyse auf eine Konzentration von 50 mM eingestellt. Im Falle des Pyroclavins erfolgte mittels HPLC eine zusätzliche Aufreinigung (Kap. 2.5.2), um verbliebene Kieselgel-Kontaminationen, die in den NMR-Spektren stören, zu entfernen.

2.5.2 Umkehr-Phasen-HPLC (*reverse phase* HPLC)

Alle HPLC-Analysen innerhalb dieser Arbeit erfolgten an den 1200 Serien HPLC-Anlagen der Firma Agilent (Böblingen). Hierbei wurde als Hauptsäule eine Multospher RP-18-Säule (250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 μm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die Hauptsäule wurde von einer mit Multoprep RP-18 gefüllten Vorsäule (30 mm x 4 mm, Partikelgröße 40 μm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) geschützt. Die Detektion erfolgte mit dem anlageninternen Photodioden-Array-Detektor über einen Wellenlängenbereich von 190 bis 400 nm. Zur Isolierung der Substanzen im Milligramm-Maßstab wurde eine präparative Multospher RP-18-Säule (250 mm x 10 mm, Partikelgröße 5 μm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) in Kombination mit einer mit Multoprep RP-18 gefüllten Vorsäule (50 mm x 10 mm, Partikelgröße 40 μm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) verwendet. Bei der präparativen Säule wurde die Flussrate auf 2,5 ml/min erhöht. Als Lösungsmittel wurden Wasser (Lösungsmittel A) und Acetonitril (Lösungsmittel B) bzw. Methanol (Lösungsmittel C) verwendet. Beiden Lösungsmitteln wurde 0,5% (v/v) Trifluoressigsäure zugesetzt. In allen nachfolgend beschriebenen Methoden erfolgte ein 5-minütiger Waschschrift der Säule mit 100 % des Lösungsmittels B bzw. C und eine Äquilibration der Säule mit der gleichen Konzentration des Lösungsmittels B bzw. C, mit der die Methode gestartet wurde.

Bei den Reaktionsansätzen zur Auffindung der enzymatischen Aktivität von FtmO (Kap. 3.3) wurde zunächst für 4 min 25 % Acetonitril und anschließend ein Gradient von 25 auf 100 % Acetonitril über 24 min verwendet. Zur Isolierung des DMA-L-Abrin (Kap. 3.4) wurde Methanol mit 0,5% (v/v) Trifluoressigsäure als Lösungsmittel genutzt und ein Gradient von 35 auf 100 % Lösungsmittel C über 17 min als Methode gewählt. Für die Untersuchungen der

enzymatischen Aktivität hingegen wurde erneut Acetonitril als Lösungsmittel benutzt. Die Auftrennung erfolgte zunächst für 8 min mit 25 % Acetonitril und dann über einen Gradienten von 25 auf 35 % Lösungsmittel B über 20 min.

Für die Analyse der Reaktionsansätze, in denen das Protein EasG verwendet wurde (Abb. 3-33, Abb. 3-34, Abb. 3-38 und Abb. 3-39), fand die Trennung der Substanzen über einen Gradienten von 38 auf 54 % Lösungsmittel B über 10 min statt. Die Isolierung des Agroclavins erfolgte über einen Gradienten von 30 auf 37 % Lösungsmittel B über 28 min. Zur Untersuchung der nicht-enzymatischen Reaktion von GSH mit Chanoclavin-I-Aldehyd (Abb. 3-35, Abb. 3-36 und Abb. 3-37) wurde zunächst 10 % Acetonitril für 14 min und anschließend ein Gradienten von 10 auf 74 % Acetonitril über 17 min gewählt. Für die Trennung von Festuclavin und Agroclavin in Abb. 3-40 wurden die Proben mit 21 % Lösungsmittel B über 38 min eluiert.

Zur Analyse der enzymatischen Reaktionsansätze der Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Pyroclavin und Festuclavin (Kap. 3.7) wurde eine Methode mit 21 % Lösungsmittel B über 60 min benutzt. Für die Isolierung des Pyroclavins wurde ein Gradienten von 25 auf 42 % Lösungsmittel B über 28 min verwendet.

2.5.3 Massenspektrometrie (MS)

Die Messungen der Elektrospray-Ionisation-Spektren (ESI-Spektren) von Agroclavin (Anhang Abb. 6-33), des Chanoclavin-I-Aldehyd-DTT Intermediats (Anhang Abb. 6-34) und des Pyroclavins (Anhang Abb. 6-46), sowie die Messung des hochaufgelösten Elektronenstoß-Ionisation-Spektrums (HR-EI-Spektrums) von Pyroclavin erfolgten durch Dr. Laufenberg an einem AutoSpec-Gerät der Firma Micromass Co. UK Ltd.

2.5.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Nach der Isolierung der Substanzen erfolgte das Trocknen dieser über mehrere Tage im Gefriertrockner. Anschließend wurden die Proben in deuteriertem Lösungsmittel der Firma Eurisotop (Tab. 2-1) aufgenommen. Von den isolierten Substanzen wurden zunächst ^1H -NMR-Spektren durch Dr. Kämpchen an einem JEOL ECA-500 Spektrometer (JEOL, München) aufgenommen. Wurden weitere NMR-Spektren der Substanzen benötigt, darunter ^{13}C -NMR-, DQF-COSY-, HSQC-, HMBC-, NOESY und ROESY-Spektren, erfolgten die Messungen durch Dr. Xie. In diesen Fällen wurde nochmals ein ^1H -NMR-Spektrum an derselben Anlage gemessen. Als Anlage wurde ein Bruker AVANCE-600 Spektrometer und für die ^{13}C -Spektren ein Bruker DRX-400 Spektrometer verwendet. Die Messungen erfolgten bei 300 K. Die Datenauswertung erfolgte mit der TOPSPIN 2.1 Software (Bruker) bzw. mit der Software Delta 5.0.1 (JEOL).

3. Ergebnisse

3.1 Vorkommen von Ergotalkaloidgenclustern innerhalb der Ascomyceten

3.1.1 Identifizierung der Ergotalkaloidgencluster

Zur Untersuchung des Vorkommens von Ergotalkaloidgenclustern innerhalb der Ascomyceten wurden aus 53 verschiedenen Pilzfamilien 138 in der NCBI-Datenbank verfügbare Pilzgenome auf Sequenzhomologien zu den sieben orthologen Genen von *A. fumigatus* Af293 und *C. purpurea* analysiert. Diese Arbeit wurde in Kooperation mit Christiane Wallwey durchgeführt, die die Genome der sieben Pilze der Arthrodermataceen, die vier *A. fumigatus*-Stämme sowie die Stämme *Metarhizium acridum* CQMa 102 und *Metarhizium anisopliae* ARSEF 23 analysierte. Die Abb. 3-1 zeigt einen *Neighbour-joining* Stammbaum basierend auf β -Tubulin Sequenzen von den 46 abgebildeten Ascomyceten. Es wurden insgesamt 23 Stämme identifiziert, die putative Ergotalkaloidgencluster enthielten. Diese gehören den Familien Arthrodermataceae, Clavicipitaceae und Trichocomaceae an.

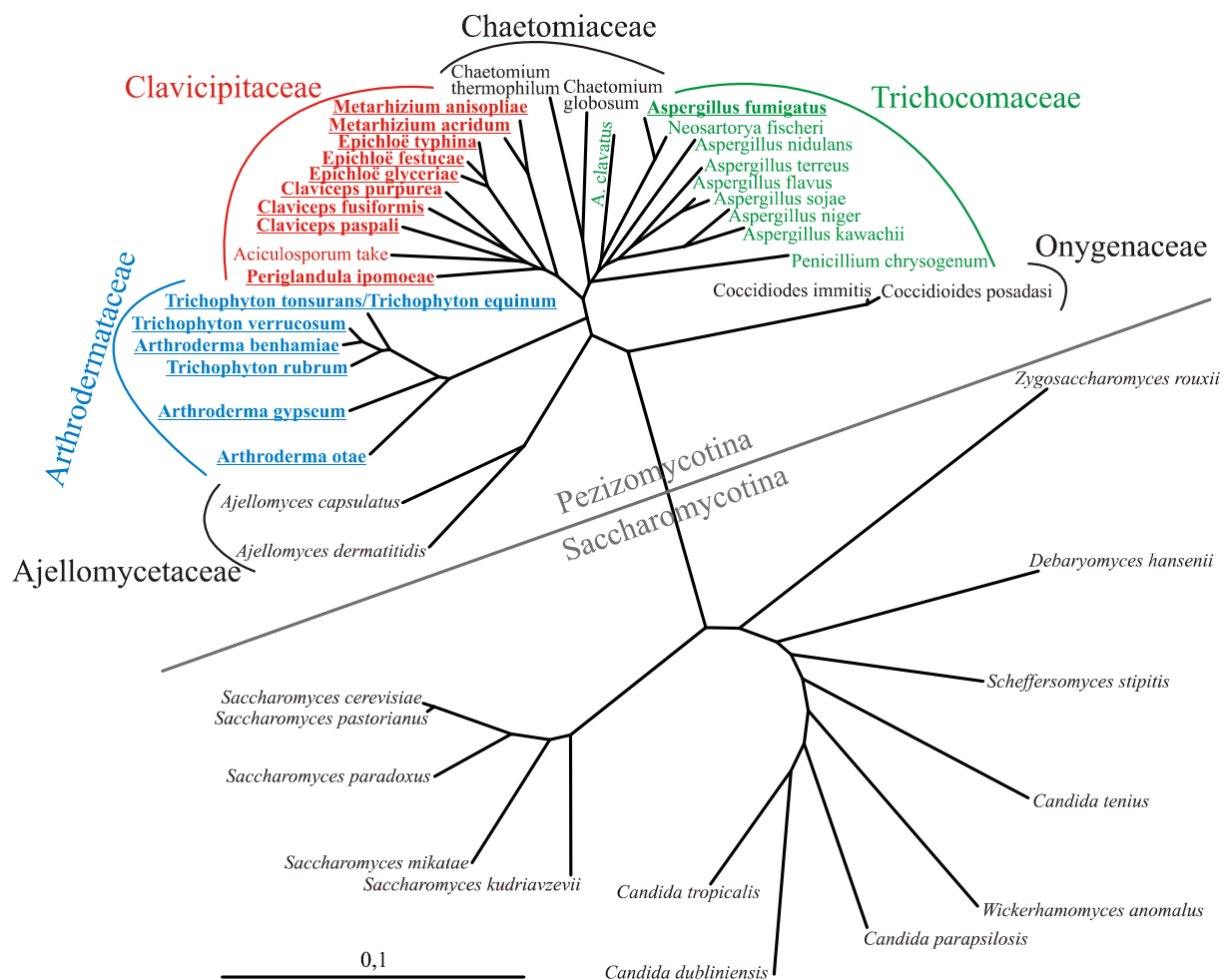


Abb. 3-1: *Neighbour-joining* Stammbaum basierend auf β -Tubulin Sequenzen der 46 analysierten Ascomyceten. Die Pilze, in denen Ergotalkaloidgene identifiziert wurden, sind unterstrichen und fett hervorgehoben.

In den Arthrodermataceen wurden in allen sieben verfügbaren Genomen Ergotalkaloidgene gefunden, während in den anderen Pilzen der Ordnung Onygenales, zu denen die Familien Ajellomycetaceae und Onygenaceae gehören, keine Ergotalkaloidgene gefunden wurden. Bei den Clavicipitaceen enthielten alle sequenzierten Stämme, mit Ausnahme von *Aciculosporum take* Ergotalkaloidgene. Dabei ist die Art *Metarhizium* noch kein bekannter Produzent von Ergotalkaloiden. Die 2 Genome der Familie Chaetomiaceae, die wie die Clavicipitaceen zu der Klasse der Sordariomyceten gehört, beinhaltet keine Ergotalkaloidgene. Im Falle der Trichocomaceen sind über 13 Genome vorhanden. Die Gene für die Produktion von Ergotalkaloiden wurden aber nur in *A. fumigatus*- und *P. commune*-Stämmen gefunden. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *P. commune* NRRL2033 konnte nicht in die Abb. 3-1 aufgenommen werden, da der Stamm noch nicht sequenziert wurde und daher keine Sequenz für β -Tubulin vorhanden ist.

3.1.2 Anordnung der Gene in den Ergotalkaloidgenclustern

Die Abb. 3-2 gibt eine Übersicht über die putativen Biosynthesegencluster von Ergotalkaloiden in Pilzen der Familien Arthrodermataceae, Clavicipitaceae und Trichocomaceae wieder.

Arthrodermataceae

Arthroderma benhamiae CBS112371 von Base 1955393 bis 1965278 (GenBank: ABSU01000001.1)

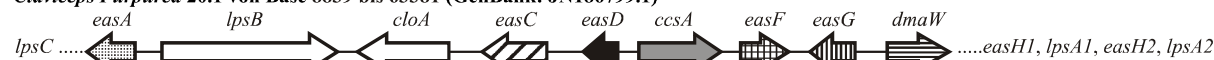


Trichophyton tonsurans CBS112818 von Base 14658 bis 4758 (GenBank: ACPI01000892.1)

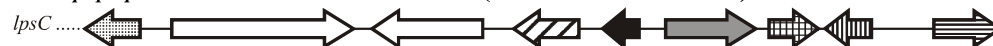


Clavicipitaceae

Claviceps Purpurea 20.1 von Base 8839 bis 63381 (GenBank: JN186799.1)



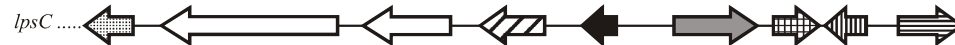
Claviceps paspali RRC1481 von Base 12081 bis 32348 (GenBank: AFRC01000012.1)



Metarhizium anisopliae ARSEF23 von Base 32312 bis 53240 (GenBank: ADNJ01000524.1)

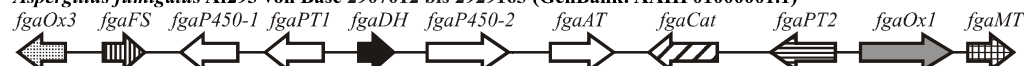


Periglandula ipomoeae IasaF13 von Base 17334 bis 36852 (GenBank: AFRD01000277.1)



Trichocomaceae

Aspergillus fumigatus Af293 von Base 2907012 bis 2929163 (GenBank: AAHF01000001.1)



Penicillium commune NRRL2033



Abb. 3-2: Putative Biosynthesegencluster von Ergotalkaloiden in Pilzen der Familien Arthrodermataceae, Clavicipitaceae und Trichocomaceae. Die jeweils orthologen Gene wurden mit gleichen Mustern dargestellt und die nicht-orthologen Gene als weiße Pfeile.

Dabei enthalten die Ergotalkaloidgencluster der Pilze der Familie Clavicipitaceae und Trichocomaceae sieben orthologe Gene, die Pilze der Familie Arthrodermataceae besitzen hingegen nur fünf dieser sieben orthologen Gene. Die Gene für *fgaOx3* und *fgaFS* bzw. *easA* und *easG* fehlen in den Ergotalkaloidgenclustern dieser Familie. Bei den beiden Genclustern der Trichocomaceen variieren die Positionen und Orientierungen der einzelnen Gene deutlich, während innerhalb der Clavicipitaceen und Arthrodermataceen jeweils gleiche Positionen und Orientierungen der einzelnen Gene gefunden wurden.

3.1.3 Proteinsequenzvergleiche der orthologen Ergotalkaloidgene

In der Tab. 3-1 wurden die Sequenzidentitäten für die orthologen Gene innerhalb und zwischen den Familien aufgelistet. Dabei wurden die höchsten Sequenzidentitäten (77 % bis 99 %) innerhalb der Familie Arthrodermataceae gefunden, gefolgt von den Pilzen der Clavicipitaceen mit 52 % bis 85% und den Pilzen der Trichocomaceen mit 46 % bis 77 %. Zwischen den Familien ergaben sich Sequenzidentitäten von 44 % (FgaOx1 mit EasE) bis 67 % (FgaDH mit EasD) beim Vergleich der orthologen Gene von *A. fumigatus* Af293 mit *C. purpurea* 20.1. Der Vergleich von *A. fumigatus* Af293 mit *Arthroderma benhamiae* (*A. benhamiae*) CBS 112371 ergab Sequenzidentitäten von 45 % (FgaOx1) bis 69 % (FgaDH). Schließlich wurden Sequenzidentitäten von 48 % (FgaOx1) bis 65 % (FgaDH) für den Vergleich von *C. purpurea* 20.1 mit *A. benhamiae* CBS 112371 erhalten.

Zusätzlich zum direkten Sequenzvergleich wurden Multi-Proteinsequenzvergleiche aller orthologen Proteine mit dem Programm ClustalW2 durchgeführt (Anhang Abb. 6-1 bis Abb. 6-7). Zur besseren Übersicht wurden die streng konservierten Aminosäuren in Abb. 3-3 zusammengefasst. Mit Ausnahme von FgaOx1 wiesen alle sieben Proteine eine hohe Anzahl von streng konservierten Aminosäuren auf. Die Prenyltransferasen und die *old yellow enzymes* enthielten jedoch einen längeren, nicht-konservierten C-terminalen Bereich. Die FAD-abhängigen Oxidoreduktasen wiesen dagegen sowohl einen längeren, nicht-konservierten N- als auch C-terminalen Bereich auf. Bei den Katalasen hingegen findet sich ein N-terminaler und ein interner nicht-konservierter Bereich. Die N-Methyltransferasen, die Alkohol-Dehydrogenasen und die Reduktasen zeigten ein gleichmäßiges Vorkommen der streng konservierten Aminosäuren.

Tab. 3-1: Sequenzidentitäten der orthologen Proteine der putativen Ergotalkaloidengcluster in Pilzen der Familie Clavicipitaceae, Trichocomaceae und Arthrodermataceae im Vergleich untereinander. Es wurden folgende Abkürzungen für die Stämme benutzt: *Claviceps purpurea* 20.1: *C.p.*, *Aspergillus fumigatus* Af293: *A.f.*, *Epichloë festucae* E2368: *E.f.*, *Metarhizium acridum* CQMa102: *M.a.* und *Arthroderma benhamiae* CBS112371: *A.b.*

Stamm	Protein <i>C.p.</i> <i>A.f.</i>	DnaW FgaPT2	EasF FgaMT	EasE FgaOx1	EasC FgaCat	EasD FgaDH	EasA FgaOx3	EasG FgaFS
Clavicipitaceae								
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1		55 % mit <i>A.f.</i>	54 % mit <i>A.f.</i>	44 % mit <i>A.f.</i>	56 % mit <i>A.f.</i>	67 % mit <i>A.f.</i>	55 % mit <i>A.f.</i>	55 % mit <i>A.f.</i>
<i>Claviceps purpurea</i> P1		CAB39314 97 % mit <i>C.p.</i>	AAW57090 99 % mit <i>C.p.</i>	CAB39328 98 % mit <i>C.p.</i>	CAG28311 98 % mit <i>C.p.</i>	CAB39316 99 % mit <i>C.p.</i>	CAG28312 89 % mit <i>C.p.</i>	AAW57089 99 % mit <i>C.p.</i>
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980		66 % mit <i>C.p.</i>	71 % mit <i>C.p.</i>	69 % mit <i>C.p.</i>	75 % mit <i>C.p.</i>	80 % mit <i>C.p.</i>	78 % mit <i>C.p.</i>	60 % mit <i>C.p.</i>
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481		67 % mit <i>C.p.</i>	64 % mit <i>C.p.</i>	59 % mit <i>C.p.</i>	69 % mit <i>C.p.</i>	77 % mit <i>C.p.</i>	75 % mit <i>C.p.</i>	57 % mit <i>C.p.</i>
<i>Epichloë festucae</i> E2368		63 % mit <i>C.p.</i>	60 % mit <i>C.p.</i>	52 % mit <i>C.p.</i>	69 % mit <i>C.p.</i>	71 % mit <i>C.p.</i>	72 % mit <i>C.p.</i>	54 % mit <i>C.p.</i>
<i>Epichloë festucae</i> F11		64 % mit <i>C.p.</i> 99 % mit <i>E.f.</i>	60 % mit <i>C.p.</i> 100 % mit <i>E.f.</i>	52 % mit <i>C.p.</i> 100 % mit <i>E.f.</i>	69 % mit <i>C.p.</i> 100 % mit <i>E.f.</i>	71 % mit <i>C.p.</i> 100 % mit <i>E.f.</i>	72 % mit <i>C.p.</i> 100 % mit <i>E.f.</i>	54 % mit <i>C.p.</i> 100 % mit <i>E.f.</i>
<i>Epichloë glyceriae</i> E277		65 % mit <i>C.p.</i> 87 % mit <i>E.f.</i>	60 % mit <i>C.p.</i> 94 % mit <i>E.f.</i>	52 % mit <i>C.p.</i> 93 % mit <i>E.f.</i>	69 % mit <i>C.p.</i> 95 % mit <i>E.f.</i>	70 % mit <i>C.p.</i> 95 % mit <i>E.f.</i>	74 % mit <i>C.p.</i> 96 % mit <i>E.f.</i>	54 % mit <i>C.p.</i> 92 % mit <i>E.f.</i>
<i>Epichloë typhina</i> E5819		64 % mit <i>C.p.</i> 99 % mit <i>E.f.</i>	60 % mit <i>C.p.</i> 98 % mit <i>E.f.</i>	52 % mit <i>C.p.</i> 99 % mit <i>E.f.</i>	69 % mit <i>C.p.</i> 99 % mit <i>E.f.</i>	70 % mit <i>C.p.</i> 98 % mit <i>E.f.</i>	72 % mit <i>C.p.</i> 100 % mit <i>E.f.</i>	54 % mit <i>C.p.</i> 100 % mit <i>E.f.</i>
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102		66 % mit <i>C.p.</i>	70 % mit <i>C.p.</i>	62 % mit <i>C.p.</i>	71 % mit <i>C.p.</i>	76 % mit <i>C.p.</i>	75 % mit <i>C.p.</i>	55 % mit <i>C.p.</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23		67 % mit <i>C.p.</i> 88 % mit <i>M.a.</i>	71 % mit <i>C.p.</i> 93 % mit <i>M.a.</i>	61 % mit <i>C.p.</i> 87 % mit <i>M.a.</i>	72 % mit <i>C.p.</i> 96 % mit <i>M.a.</i>	76 % mit <i>C.p.</i> 96 % mit <i>M.a.</i>	75 % mit <i>C.p.</i> 92 % mit <i>M.a.</i>	55 % mit <i>C.p.</i> 93 % mit <i>M.a.</i>
<i>Periglandula ipomoeae</i> IasaF13		73 % mit <i>C.p.</i>	74 % mit <i>C.p.</i>	72 % mit <i>C.p.</i>	77 % mit <i>C.p.</i>	85 % mit <i>C.p.</i>	84 % mit <i>C.p.</i>	61 % mit <i>C.p.</i>

Fortsetzung Tab. 3-1:

Stamm	Protein <i>C.p.</i> <i>A.f.</i>	DmaW FgaPT2	EasF FgaMT	EasE FgaOx1	EasC FgaCat	EasD FgaDH	EasA FgaOx3	EasG FgaFS
Trichocomaceae								
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293		EAL94103 55 % mit <i>C.p.</i>	EAL94105 54 % mit <i>C.p.</i>	EAL94104 44 % mit <i>C.p.</i>	EAL94102 56 % mit <i>C.p.</i>	EAL94099 67 % mit <i>C.p.</i>	EAL94095 55 % mit <i>C.p.</i>	EAL94096 47 % mit <i>C.p.</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163		100 % mit <i>A.f.</i>	100 % mit <i>A.f.</i>	100 % mit <i>A.f.</i>	100 % mit <i>A.f.</i>	100 % mit <i>A.f.</i>	99 % mit <i>A.f.</i>	100 % mit <i>A.f.</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10		100 % mit <i>A.f.</i>	100 % mit <i>A.f.</i>	100 % mit <i>A.f.</i>	100 % mit <i>A.f.</i>	100 % mit <i>A.f.</i>	99 % mit <i>A.f.</i>	100 % mit <i>A.f.</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210		99 % mit <i>A.f.</i>	99 % mit <i>A.f.</i>	100 % mit <i>A.f.</i>	99 % mit <i>A.f.</i>	100 % mit <i>A.f.</i>	98 % mit <i>A.f.</i>	99 % mit <i>A.f.</i>
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033		59 % mit <i>A.f.</i>	61 % mit <i>A.f.</i>	46 % mit <i>A.f.</i>	62 % mit <i>A.f.</i>	77 % mit <i>A.f.</i>	64 % mit <i>A.f.</i>	61 % mit <i>A.f.</i>
Arthrodermataceae								
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371		61 % mit <i>A.f.</i> 57 % mit <i>C.p.</i>	65 % mit <i>A.f.</i> 59 % mit <i>C.p.</i>	45 % mit <i>A.f.</i> 48 % mit <i>C.p.</i>	62 % mit <i>A.f.</i> 55 % mit <i>C.p.</i>	69 % mit <i>A.f.</i> 65 % mit <i>C.p.</i>	-	-
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893		Genom nicht vollständig	65 % mit <i>A.f.</i> 90 % mit <i>A.b.</i>	46 % mit <i>A.f.</i> 85 % mit <i>A.b.</i>	62 % mit <i>A.f.</i> 95 % mit <i>A.b.</i>	69 % mit <i>A.f.</i> 90 % mit <i>A.b.</i>	-	-
<i>Arthroderma otiae</i> CBS113480		60 % mit <i>A.f.</i> 92 % mit <i>A.b.</i>	66 % mit <i>A.f.</i> 88 % mit <i>A.b.</i>	46 % mit <i>A.f.</i> 77 % mit <i>A.b.</i>	61 % mit <i>A.f.</i> 92 % mit <i>A.b.</i>	70 % mit <i>A.f.</i> 98 % mit <i>A.b.</i>	-	-
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97		60 % mit <i>A.f.</i> 98 % mit <i>A.b.</i>	65 % mit <i>A.f.</i> 96 % mit <i>A.b.</i>	Genom nicht vollständig	62 % mit <i>A.f.</i> 96 % mit <i>A.b.</i>	Genom nicht vollständig	-	-
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892		Genom nicht vollständig	65 % mit <i>A.f.</i> 97 % mit <i>A.b.</i>	45 % mit <i>A.f.</i> 94 % mit <i>A.b.</i>	62 % mit <i>A.f.</i> 97 % mit <i>A.b.</i>	70 % mit <i>A.f.</i> 96 % mit <i>A.b.</i>	-	-
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818		60 % mit <i>A.f.</i> 98 % mit <i>A.b.</i>	65 % mit <i>A.f.</i> 96 % mit <i>A.b.</i>	45 % mit <i>A.f.</i> 94 % mit <i>A.b.</i>	61 % mit <i>A.f.</i> 96 % mit <i>A.b.</i>	68 % mit <i>A.f.</i> 96 % mit <i>A.b.</i>	-	-
<i>Trichophyton verrucosum</i> HK10517		61 % mit <i>A.f.</i> 99 % mit <i>A.b.</i>	65 % mit <i>A.f.</i> 98 % mit <i>A.b.</i>	45 % mit <i>A.f.</i> 97 % mit <i>A.b.</i>	63 % mit <i>A.f.</i> 99 % mit <i>A.b.</i>	66 % mit <i>A.f.</i> 96 % mit <i>A.b.</i>	-	-

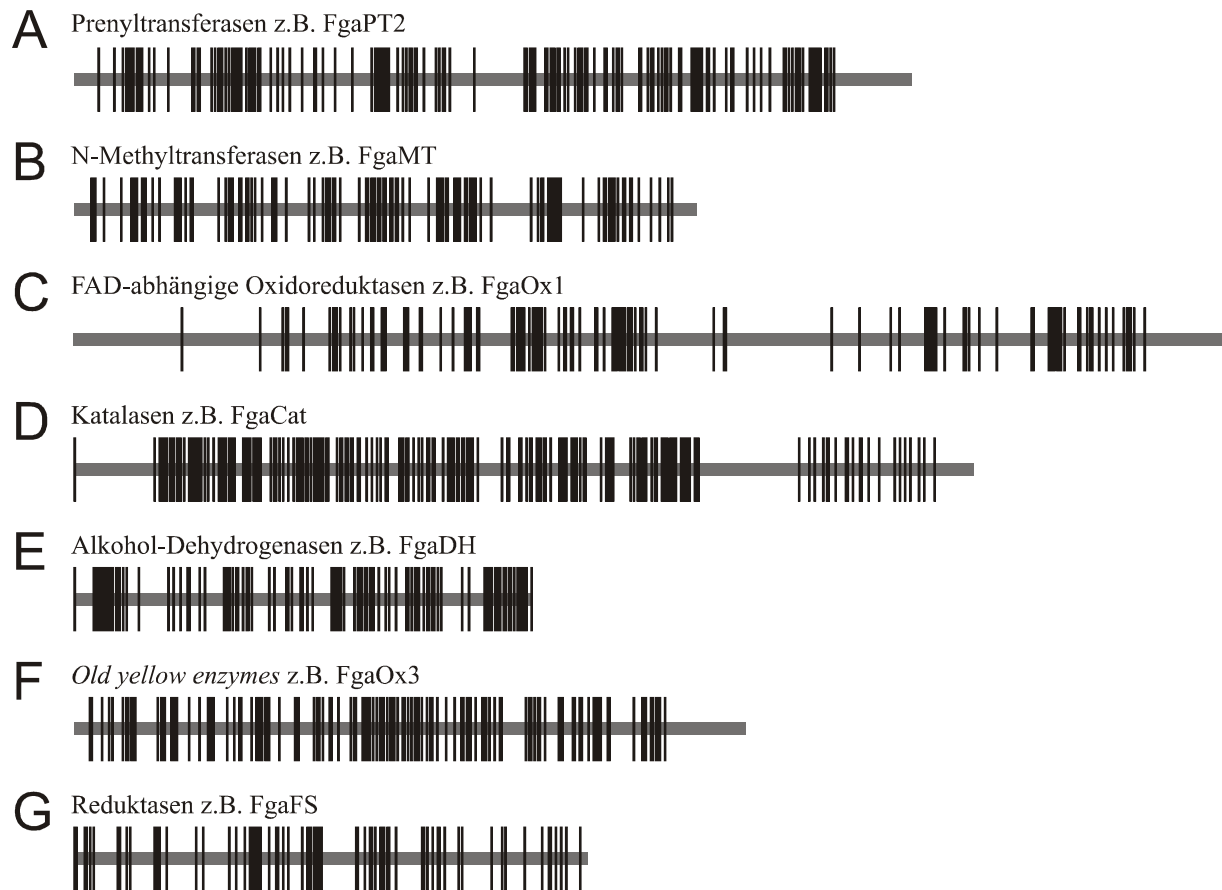


Abb. 3-3: Darstellung der streng konservierten Aminosäuren der sieben orthologen Proteine. Die konservierten Aminosäuren wurden aus den in dieser Arbeit identifizierten Proteinen der putativen Ergotalkaloidgencluster über Multi-Proteinsequenzvergleiche ermittelt.

3.1.4 Phylogenetische Analyse

Die phylogenetischen Analysen der sieben orthologen Gene aus den 23 identifizierten putativen Ergotalkaloidgenclustern wurden mit den Programmen ClustalW2 und Tree View 1.6.6 durchgeführt (Anhang Abb. 6-8 bis Abb. 6-11). Die *Neighbour-joining* Stammbäume der Katalasen, Alkohol-Dehydrogenasen, FAD-abhängigen Oxidoreduktasen, N-Methyltransferasen und Prenyltransferasen (z.B. *fgaCat*, *fgaDH*, *fgaOx1*, *fgaMT* und *fgaPT2*) enthalten die orthologen Gene der Familien Arthrodermataceae, Clavicipitaceae und Trichocomaceae. In den Stammbäumen der *old yellow enzymes* und der Reduktasen fehlen die Pilze der Familie Arthrodermataceae, da die entsprechenden Gene im Cluster nicht vorhanden sind. Die phylogenetischen Stammbäume der Katalasen, Alkohol-Dehydrogenasen und N-Methyltransferasen (Anhang Abb. 6-8 und Abb. 6-9) unterteilen sich in zwei Bereiche. Der erste enthält die Pilze der Clavicipitaceen und der zweite die Pilze der Arthrodermataceen und Trichocomaceen. Die Stammbäume der Prenyltransferasen und FAD-abhängigen Oxidoreduktasen (Anhang Abb. 6-10) wiederum ähneln den zuvor genannten, wobei sich die Pilze der Gattung *Epichloë* stärker von den anderen Pilzen der Clavicipitaceen absondern. Ähnliches konnte bei den Stammbäumen der *old yellow enzymes* und Reduktasen (Anhang Abb. 6-11) beobachtet wer-

den, in denen die Pilze der Trichocomaceen, der Clavicipitaceen und die stärker abgetrennte Gattung *Epichloë*, jeweils eine Gruppe bilden. Bei den *old yellow enzymes* enthält die Gruppe der *Epichloën* zusätzlich die Pilze der Gattung *Metarhizium*.

3.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung

3.2.1 Klonierung und Expression von *ftmO* aus *A. fumigatus*

3.2.1.1 Klonierung und Expression von *ftmO* in *S. cerevisiae*

Das Gen *ftmO* wurde in einer vorherigen Arbeit von Alexander Grundmann aus genomischer DNA von *A. fumigatus* Af293 (BAC AfB8B11) amplifiziert, in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert (pAG029) und sequenziert (Grundmann 2008). Das Plasmid pAG029 wurde innerhalb dieser Arbeit mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I geschnitten (Abb. 3-4, Laufspur 2) und das 2055 bp lange DNA-Fragment in den Expressionsvektor pYES2/NT C umklontiert (Laufspur 3), der zuvor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten wurde.

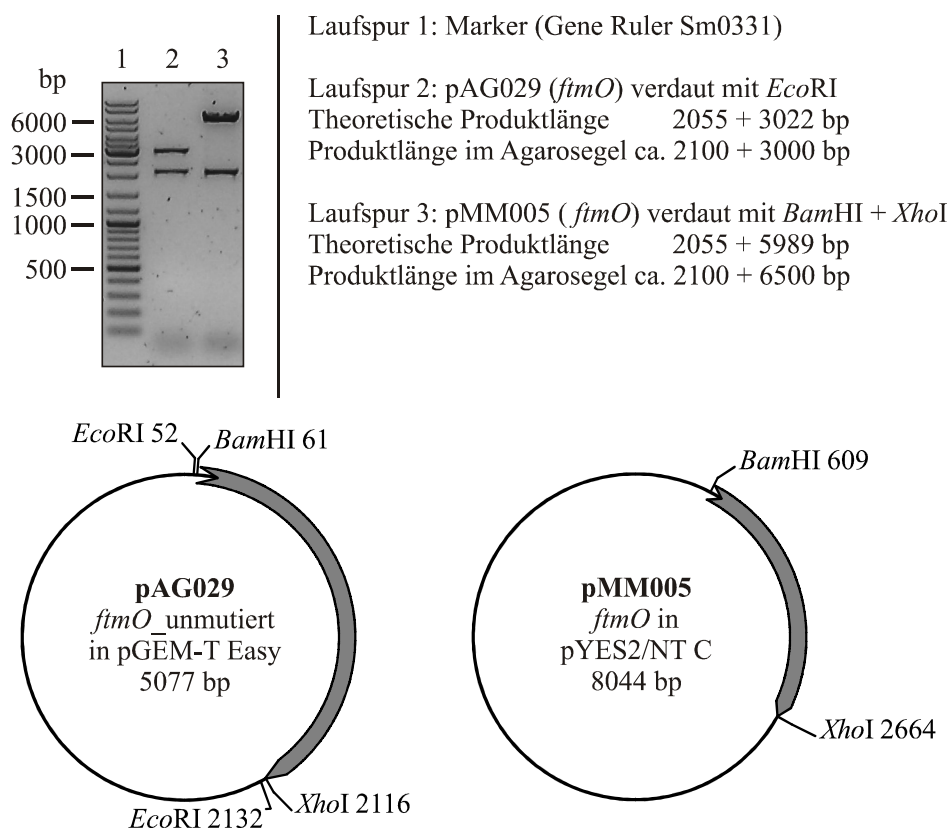


Abb. 3-4: 1 %iges Agarosegel zu der Klonierung von pMM005 und die beiden zugehörigen Vektorkarten pAG029 und pMM005.

Das nach der Umklonierung erhaltene Plasmid wurde als pMM005 bezeichnet (Abb. 3-4) und mittels Elektroporation in *S. cerevisiae* INVSc1-Zellen eingebracht. Die Abb. 3-5 zeigt einen Expressionstest von *ftmO* in *S. cerevisiae*. Es wurde ein theoretisches Molekulargewicht von

76 kDa für das Fusionsprotein erwartet. In der Laufspur 5, die das Eluat nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose enthielt, konnte jedoch keine Proteinbande bei 76 kDa erkannt werden. Da zeitgleich auch die Expression von *ftmO* in *E. coli* (pMM007) getestet wurde und diese zu einer deutlichen Überexpression führte, wurden keine weiteren Expressionsversuche in *S. cerevisiae* durchgeführt.

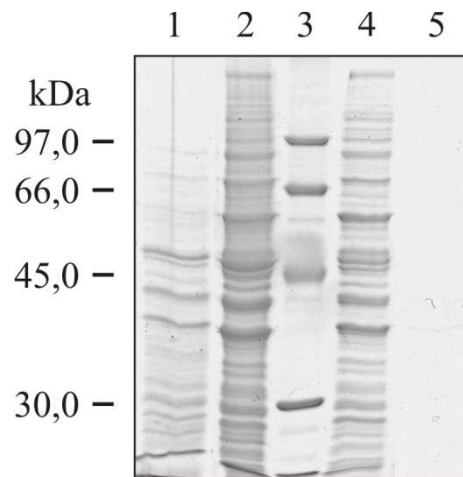


Abb. 3-5: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von FtmO-His₆ (pMM005) in *S. cerevisiae*. Spur 1: Expressionsstatus vor der Induktion, Spur 2: Gesamtprotein nach 15 h Induktion, Spur 3: Proteingrößenstandard, Spur 4: Löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 5: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose.

3.2.1.2 Klonierung und Expression von *ftmO* in *E. coli* XL1-Blue

Für die Expression von *ftmO* in *E. coli* XL1-Blue, wurde das Plasmid pMM006 (in pGEM-T Easy) erstellt (Abb. 3-6). Der Ansatz und die Bedingungen für die PCR mit dem Plasmid pAG29 und den Primern *ftmO*_for und *ftmO*_rev (Kap. 2.1.4) sind im Kap. 2.3.6 beschrieben. Das 2053 bp lange PCR-Produkt bestand aus dem Gen *ftmO* mit den neu eingefügten Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Bam*HI für die Klonierung in den Expressionsvektor pQE-60. Nach der Überprüfung des Plasmids pMM006 mittels Sequenzierung wurde das 2042 bp lange DNA-Fragment über die Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Bam*HI in den Expressionsvektor pQE-60 umkloniert, der zuvor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten wurde. Das erhaltene Plasmid wurde als pMM007 bezeichnet. Wie in der Vektorkarte von pMM006 (Abb. 3-6) zu erkennen, enthielt das Gen *ftmO* eine interne *Nco*I-Schnittstelle und musste daher durch partielle Restriktion umkloniert werden (Kap. 2.3.3.1). Die Testrestriktionen in den Laufspuren 3 und 4 in Abb. 3-6 zeigten, dass das komplette DNA-Fragment in den Expressionsvektor pQE-60 umkloniert wurde.

Das Plasmid pMM007 wurde mittels Hitzeschock-Transformation in CaCl₂-kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen eingebracht. Die Expressionsbedingungen wurden bis zu einer Proteinausbeute von 0,3 mg/l Kultur optimiert (Abb. 3-7, Laufspur 5). Dabei wurden die Zellen bei 22 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert und die Expression für 15 h bei 22 °C mit

0,1 mM IPTG induziert. Da die Ni-NTA-Agarose-Elution bei Verwendung von 120 µl Ni-NTA-Agarose in Laufspur 5 noch starke Verunreinigungen enthielt, erfolgte im nächsten Schritt eine Optimierung der Bedingungen für die Aufreinigung.

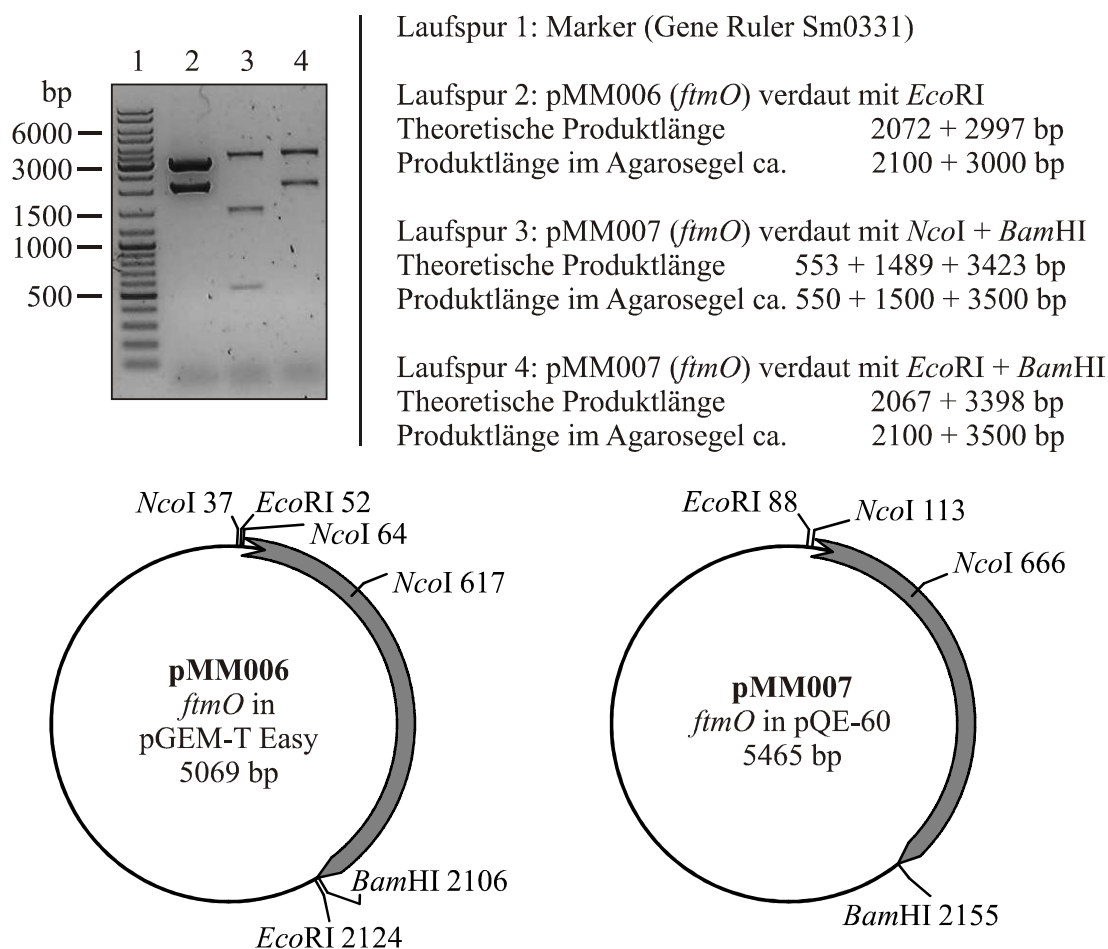


Abb. 3-6: 1 %iges Agarosegel zu der Klonierung von pMM007 und die beiden zugehörigen Vektorkarten pMM006 und pMM007.

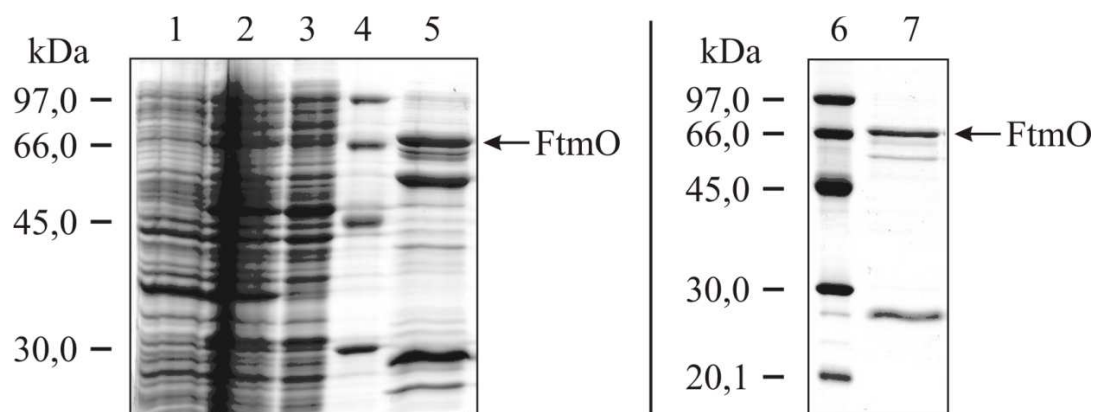


Abb. 3-7: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von FtmO-His₆ (pMM007) in *E. coli*. Spur 1: Expressionsstatus vor der Induktion, Spur 2: Gesamtprotein nach 15 h Induktion, Spur 3: Löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 4 und 6: Proteingrößenstandard, Spur 5: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose mit 20 mM Imidazol im Waschpuffer, Spur 7: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose mit 60 mM Imidazol im Waschpuffer.

Die Imidazolkonzentration des Waschpuffers wurde dazu schrittweise von 20 mM Imidazol (Standardbedingung) auf 30, 50 und 60 mM Imidazol erhöht. Die Laufspur 7 in Abb. 3-7 zeigt den Reinigungsgrad bei Verwendung von 60 mM Imidazol im Waschpuffer. Die Erhöhung des Imidazols im Waschpuffer auf 60 mM reduzierte zwar die Menge an Verunreinigungen, es verblieb aber trotzdem eine signifikante Verunreinigung bei ca. 27 kDa. Bei dieser Verunreinigung handelt es sich sehr wahrscheinlich um das Histidin-reiche *E. coli* Protein SlyD (Wülfing *et al.*, 1994). Die Proteinausbeute konnte auf 0,2 mg pro Liter Kultur bestimmt werden.

3.2.2 Optimierung der Aufreinigung von FtmPT1 aus *A. fumigatus*

Für die in Kooperation mit der Universität Tübingen durchgeführten Kristallisationsversuche wurde die Aufreinigung von FtmPT1 (pAG012) im Hinblick auf den Reinigungsgrad des aufgereinigten Proteins optimiert. Die Kultivierung und Expression erfolgte nach dem von Alexander Grundmann beschriebenen Protokoll (Grundmann & Li 2005). Die Kultivierung und Expression, sowie die durchgeführten Optimierungen der Aufreinigung von FtmPT1 sind in Kap. 2.4.4 beschrieben. Die Abb. 3-8 zeigt die SDS-PAGE der wichtigsten Schritte zur Aufreinigung von FtmPT1-His₆. Durch eine Reduzierung der verwendeten Menge an Ni-NTA-Agarose pro Liter Kultur enthielten die Ni-NTA-Agarose-Elutionsfraktionen (Laufspur 2 bis 5) nur noch sehr leichte Verunreinigungen. Um eine mögliche negative Beeinflussung der Kristallisationsversuche durch die geringen Mengen an verbliebenen Verunreinigungen auszuschließen, wurde zusätzlich eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. In den Laufspuren 7 bis 8 sind die nach der Größenausschlusschromatographie erhaltenen Fraktionen A bis C abgebildet, die für Kristallisationsversuche an die Universität Tübingen versendet wurden.

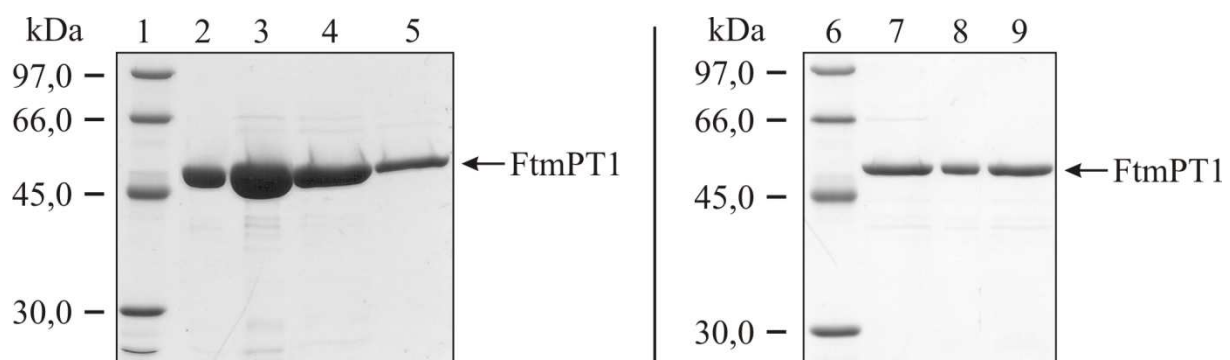


Abb. 3-8: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von FtmPT1-His₆ (pAG012) in *E. coli*. Spur 1 und 6: Proteingrößenstandard, Spur 2: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose 1. Fraktion, Spur 3: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose 2. Fraktion, Spur 4: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose 3. Fraktion, Spur 5: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose 4. Fraktion, Spur 7 bis 9: Reinigungsgrad der 1. Fraktion bis 3. Fraktion nach der Größenausschlusschromatographie.

Die Abb. 3-9 zeigt die Bereiche im Elutionschromatogramm der Größenausschlusschromatographie in denen die drei Fraktionen gesammelt wurden. Bevor die gesammelten 2 ml Einzelfraktionen zu den Fraktionen A bis C vereint wurden, erfolgte eine Kontrolle mittels SDS-PAGE auf den jeweiligen Reinigungsgrad. Das Elutionschromatogramm zeigte zwei Peaks. Der Erste (48 ml) lag sehr nahe an dem Ausschlußvolumen von 46,5 ml der HiLoad 16/60 Superdex 200-Säule. Es handelt sich bei diesem Peak wahrscheinlich um denaturiertes FtmPT1, das daher verworfen wurde. Der zweite Peak (73 ml) entspricht einem Molekulargewicht von 114 kDa. Das theoretische Molekulargewicht von FtmPT1-His₆ (pAG012) wurde auf 54 kDa berechnet. Daher lag das native FtmPT1-His₆ als Dimer vor. Dieses Ergebnis wurde später durch die Kristallstrukturen von FtmPT1 bestätigt. Insgesamt wurden 28 mg FtmPT1-His₆ aus vier Litern Kultur für die Kristallisationsversuche erhalten.

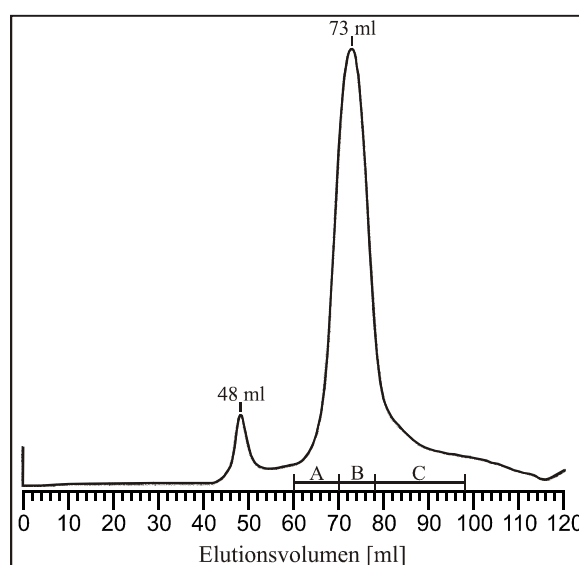


Abb. 3-9: Elutionschromatogramm der Größenausschlusschromatographie von FtmPT1-His₆ auf einer HiLoad 16/60 Superdex 200 Säule. Das Elutionsvolumen von FtmPT1-His₆ entspricht einem Dimer. Die Fraktionen A bis C wurden für die Kristallisationsexperimente verwendet.

3.2.3 Klonierung von *fgaDH* und *fgaOx3* aus *A. fumigatus*

Für die Amplifikation der putativen Gene *fgaDH* und *fgaOx3* wurde zunächst eine Analyse der Intron-Exon-Struktur der Gene von *A. fumigatus* Af293 mit dem Programm FGENESH (<http://linux1.softberry.com>) durchgeführt. Die Ergebnisse der Analyse wurden mit den Einträgen der Gene in der NCBI-Datenbank verglichen. Die Tab. 3-2 gibt eine Zusammenfassung des Vergleichs wieder. Da die Sequenzen der Gene *fgaDH* und *fgaOx3* in beiden Fällen identisch waren, wurden die Primer *fgaDH_for* und *fgaDH_rev2* bzw. *fgaOx3_for* und *fgaOx3_rev2* (Kap. 2.1.4) zur Amplifikation der Gene anhand der Start- und Stoppcodons der NCBI-Einträge von *A. fumigatus* Af293 entwickelt. Für beide Gene wurde jedoch zur Kontrolle des NCBI-Stoppcodons ein zusätzlicher Primer entwickelt (*fgaDH_rev* bzw. *fgaOx3_rev*), der 17 bzw. 23 Nukleotide nach dem NCBI-Stoppcodon an die cDNA bindet. Zur Amplifikation der beiden Gene mittels PCR wurde eine cDNA-Bibliothek von *A. fumigatus* B5233 verwendet. Die Ansätze und Bedingungen der jeweiligen PCR sind im Kap. 2.3.6 beschrieben. Für das Gen *fgaDH* konnte sowohl das PCR-Produkt mit den eingefügten *NcoI*- und *BamHI*-Restriktionsschnittstellen mit den Primern *fgaDH_for* und *fgaDH_rev2* (866 bp), als auch das PCR-Produkt für die Kontrolle des Stoppcodons (896 bp) mit den Primern *fgaDH_for* und *fgaDH_rev* erhalten und in den Klonierungsvektor pGEM-T

Easy kloniert werden. Die PCR mit den Primern *fgaOx3_for* und *fgaOx3_rev2*, die die *SphI*- bzw. *BamHI*-Restriktionsschnittstellen enthielten ergab kein Produkt. Allerdings konnte das 1183 bp lange Produkt für die Kontrolle des Stoppcodons mit den Primern *fgaOx3_for* und *fgaOx3_rev* erhalten und ebenfalls in den pGEM-T Easy kloniert werden. Das in Abb. 3-10 dargestellte Konstrukt erhielt die Bezeichnung pMM004. Da im weiteren Verlauf Christiane Wallwey die

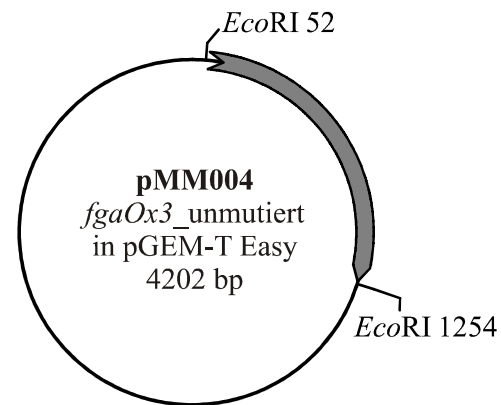


Abb. 3-10: Vektorkarte von pMM004 mit *fgaOx3_unmutiert*.

Gene *fgaDH* und *fgaOx3* untersuchte, wurden die Plasmide an sie weitergeben. Christiane Wallwey klonierte *fgaDH* in den Expressionsvektor pQE-60 um und führte die Mutation des Stoppcodons für *fgaOx3* mit den Primern *fgaOx3_for* und *fgaOx3_rev2* durch. Anschließend klonierte sie das Gen in den Expressionsvektor pQE-70 um. Die Expressionsplasmide von *fgaDH* und *fgaOx3* bezeichnete Christiane Wallwey als pCW03 bzw. pCW04 (Wallwey *et al.*, 2010a; Wallwey *et al.*, 2010b).

Tab. 3-2: Vergleich der Intron-Exon-Struktur zwischen dem Eintrag der NCBI-Datenbank und dem Ergebnis nach FGENESH für die Gene *fgaDH* und *fgaOx3*.

ORF (NCBI-Eintrag)	Exon-Bereiche nach NCBI AAHF01000001.1	Exon-Anzahl NCBI/FGENESH
<i>fgaDH</i> (AFUA_2G18000)	2914582-2915170, 2915238-2915434	2 (261 AS)/2 (261 AS)
<i>fgaOx3</i> (AFUA_2G17960)	2907012-2908142	1 (376 AS)/1 (376 AS)

3.2.4 Klonierung und Expression von *fgaFS* aus *A. fumigatus*

Im Falle des Gens *fgaFS* wurde ebenfalls eine Analyse der Intron-Exon-Struktur mit dem Programm FGENESH durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse im Vergleich mit dem NCBI-Eintrag fasst die Tab. 3-3 zusammen. Für *fgaFS* wurden nach FGENESH zwei zusätzliche Exons vorhergesagt, die in einem um 43 Aminosäuren verlängerten C-Terminus resultieren (Anhang Abb. 6-12). Da sich beide Proteine nur C-terminal unterschieden, wurden die Primer *fgaFS_for* und *fgaFS_rev2* (Kap. 2.1.4) zur Amplifikation des Gens anhand des Start- und Stoppcodon des NCBI-Eintrags von *A. fumigatus* Af293 entwickelt. Es wurde jedoch, zur Kontrolle des NCBI-Stoppcodons, ein zusätzlicher Primer *fgaFS_rev* (Kap. 2.1.4) entwickelt, der 20 Nukleotide nach dem NCBI-Stoppcodon an die cDNA bindet.

Die Ansätze und Bedingungen der PCR für das jeweilige PCR-Produkt sind im Kap. 2.3.6 aufgelistet. Die PCR-Versuche zur Amplifikation von *fgaFS* aus der cDNA von *A. fumigatus* Af293 mit den Primern *fgaFS_for* und *fgaFS_rev2* blieben erfolglos. Allerdings konnte das

952 bp lange PCR-Produkt zur Kontrolle des Stoppcodons mit den Primern *fgaFS_for* und *fgaFS_rev* erhalten werden. Dieses DNA-Fragment wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert (pMM001). Der Verdau von pMM001 (Abb. 3-11) mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* ergab ein etwa 1000 bp langes DNA-Fragment (Laufspur 2), weshalb pMM001 zur Sequenzierung an die Firma MWG geschickt wurde.

Tab. 3-3: Vergleich der Intron-Exon-Struktur zwischen dem Eintrag der NCBI-Datenbank und dem Ergebnis nach FGENESH für das Gen *fgaFS*.

ORF (NCBI-Eintrag)	Exon-Bereiche nach NCBI AAHF01000001.1	Exon-Bereiche nach FGENESH	Exon-Anzahl NCBI/FGENESH
<i>fgaFS</i> (AFUA_2G17970)	2908930-2909347, 2909400-2909596, 2909656-2909913	2908930-2909347, 2909400-2909599, 2909659-2909814, 2909882-2910011, 2910069-2910166,	3 (290 AS)/5 (333AS)

Der Sequenzvergleich der Sequenzierungsergebnisse von *fgaFS* (pMM001) aus *A. fumigatus* B5233 mit dem Referenzstamm *A. fumigatus* Af293 der NCBI-Datenbank bestätigte die Gen-Sequenz und die Intron-Exon-Struktur der NCBI-Vorhersage. Es ergaben sich jedoch zwei Punktmutationen (Base 18 G zu A und Base 61 G zu C). Die erste Punktmutation hatte keinen Effekt auf die Aminosäuresequenz, die zweite bewirkte allerdings einen Aminosäureaustausch von Asp21 in FgaFS aus *A. fumigatus* Af293 zu His21 in FgaFS aus *A. fumigatus* B5233. Die Mutation der Base 61 G zu C wurde auch in einem weiteren, sequenzierten Klon gefunden. Daher liegt sehr wahrscheinlich kein Sequenzierungsfehler, sondern ein Unterschied zwischen den beiden Stämmen vor.

Das Plasmid pMM001 wurde daher als *template* für die PCR (Ansatz und Bedingung siehe Kap. 2.3.6) zur Mutation des Stoppcodons mit den Primern *fgaFS_for* und *fgaFS_rev2* verwendet. Das 888 bp lange PCR-Produkt wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert und sequenziert. Mit dem erhaltenen Plasmid pMM002 (Abb. 3-11) konnte die Umklonierung des 876 bp langen DNA-Fragments über die Restriktionsenzyme *SphI* und *BamHI* in den Expressionsvektor pQE-70 erfolgen. Die Umklonierung ergab das Expressionskonstrukt pMM003 (Laufspur 4 und 5). Auf Grund einer internen *BamHI*-Restriktionsschnittstelle bei 508 bp (Abb. 3-11) erfolgte die Umklonierung durch eine partielle Restriktion (Kap. 2.3.3.1). Die beiden Testrestriktionen in Laufspur 4 und 5 zeigten, dass das gesamte DNA-Fragment umkloniert wurde.

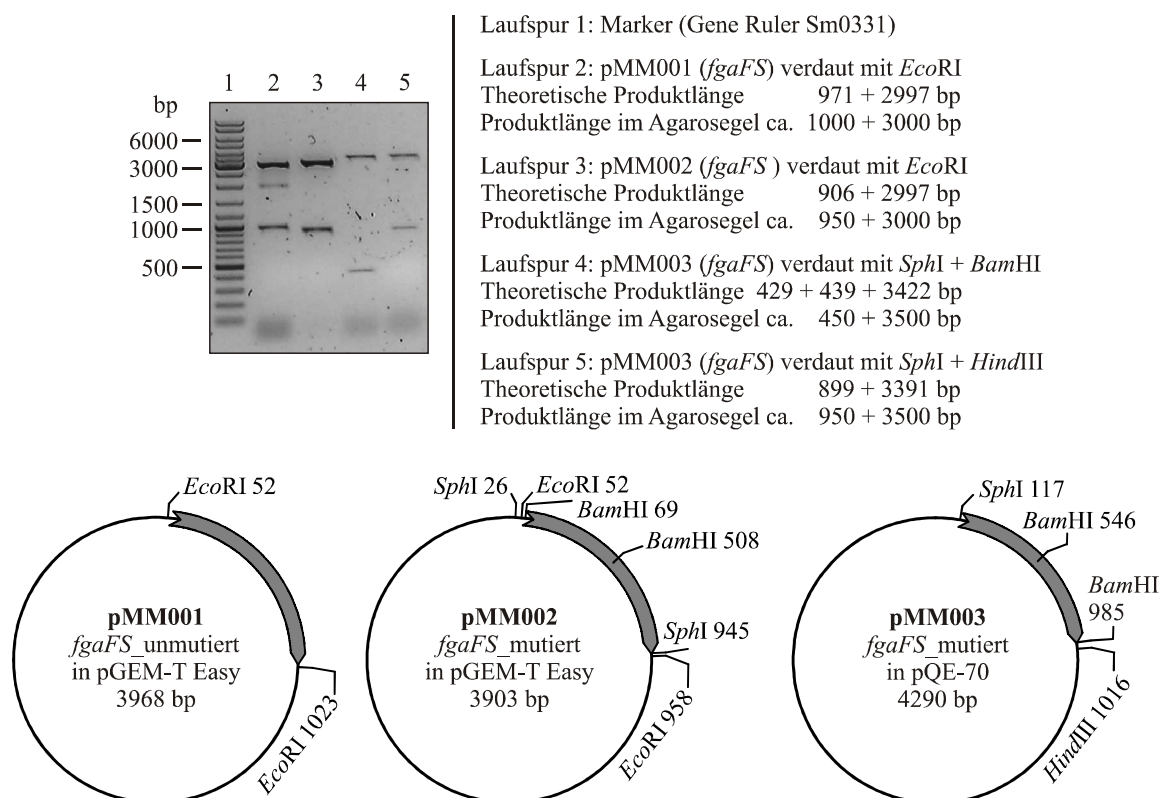


Abb. 3-11: 1 %iges Agarosegel zu der Klonierung von pMM003 und die zugehörigen Vektorkarten von pMM001, pMM002 und pMM003.

Es erfolgten Expressionstests nachdem das Plasmid pMM003 mittels Hitzeschock-Transformation in *CaCl*₂-kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen eingebracht wurde. Die Abb. 3-12 zeigt die SDS-PAGE zu der Bedingung mit der höchsten Proteinausbeute. Hierzu wurde die Zellen bei 22 °C in 1 l TB-Medium kultiviert und die Expression bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 0,1 mM IPTG für 15 h bei 22 °C induziert. Bei Verwendung von 120 µl Ni-NTA-Agarose wurde das in Laufspur 5 zu sehende fast homogene FgaFS-His₆ aufgereinigt, von dem ca. 0,4 mg aus einem Liter Kultur erhalten wurden.

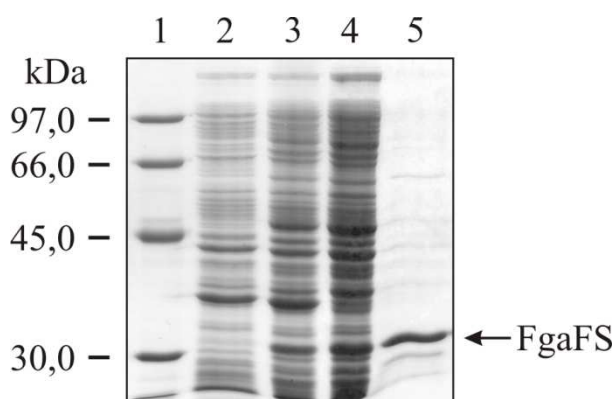


Abb. 3-12: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von FgaFS-His₆ (pMM003) in *E. coli* XL1-Blue. Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Expressionsstatus vor der Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach 15 h Induktion, Spur 4: Löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 5: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose.

3.2.5 Klonierung und Expression von *fgaOx1* aus *A. fumigatus*

3.2.5.1 Klonierung und Expression von *fgaOx1* in *E. coli* XL1-Blue

Auch im Falle des putativen Gens *fgaOx1* von *A. fumigatus* Af293 wurde eine Analyse der Intron-Exon-Struktur mit dem Programm FGENESH durchgeführt. Die Ergebnisse der Analyse und der Vergleich mit dem Eintrag der NCBI-Datenbank fasst die Tab. 3-4 zusammen. Für das Gen *fgaOx1* wurden die deutlichsten Unterschiede zwischen beiden Vorhersagen erhalten. Das Gen nach FGENESH enthielt am 3'-Ende ein zusätzliches Exon, wodurch sich eine um 274 Aminosäuren längere Proteinsequenz ergab. Ein Sequenzvergleich der beiden putativen Proteine ergab Unterschiede im N- und C-terminalen Bereich und einen identischen mittleren Bereich (Anhang Abb. 6-13).

Tab. 3-4: Vergleich der Intron-Exon-Struktur zwischen dem Eintrag der NCBI-Datenbank und dem Ergebnis nach FGENESH für das Gen *fgaOx1*.

ORF (NCBI-Eintrag)	Exon-Bereiche nach NCBI AAHF01000001.1	Exon-Anzahl NCBI/FGENESH
<i>fgaOx1</i> (AFUA_2G18050)	2925694-2925767, 2925815-2925991, 2926006-2926111, 2926217-2926726, 2926796-2927815	5 (628 AS)/6 (902 AS)

Ähnlich zu den Genen *fgaDH*, *fgaOx3* und *fgaFS* wurden die Primer *fgaOx1_for* und *fgaOx1_rev2* (Kap. 2.1.4) zur Amplifikation des Gens, trotz der Widersprüche zwischen NCBI-Eintrag und FGENESH-Vorhersage, zunächst anhand des Start- und Stoppcodons des NCBI-Eintrags von *A. fumigatus* Af293 entwickelt. Es wurde jedoch zur Kontrolle des NCBI-Stoppcodons auch für das Gen *fgaOx1* ein zusätzlicher Primer (*fgaOx1_rev*) erstellt, der 18 Nukleotide nach dem NCBI-Stoppcodon an die cDNA bindet. Für die Amplifikation des Gens wurde ebenfalls die cDNA-Bibliothek von *A. fumigatus* B5233 benutzt. Die Ansätze und Bedingungen der jeweiligen PCR sind im Kap. 2.3.6 beschrieben. Sowohl für das PCR-Produkt mit den Primern *fgaOx1_for* und *fgaOx1_rev2* als auch für den Ansatz mit *fgaOx1_for* und *fgaOx1_rev* wurden nur PCR-Produkte bei einer Primer-Anlagerungstemperatur unterhalb von 49 °C erhalten. Nach der Klonierung beider PCR-Produkte in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy stellte sich jedoch heraus, dass statt des Gens *fgaOx1* unspezifische PCR-Produkte amplifiziert wurden. Auch eine Wiederholung der PCR führte zu keinem Erfolg. Daher wurde eine neue Strategie zur Klonierung des Gens verfolgt. Der erste Teil des Gens von Base 1 bis 1022 (entspricht Base 2925694 bis 2926950 in Abb. 6-14 im Anhang), der nach dem NCBI-Eintrag vier Introns enthält, wurde über eine chemische Synthese intronfrei hergestellt. Es ergab sich ein 1077 bp langes DNA-Fragment, da für eine mögliche spätere Verwendung ein N-terminaler Histidin-tag vor das Gen eingefügt wurde. Das DNA-Fragment

wurde von der Firma DNA2.0 (Menlo, USA) chemisch synthetisiert, in den Expressionsvektor pJexpress411 kloniert und als Plasmid geliefert (pMM009) (Abb. 3-13). Der zweite, intronfreie Teil des Gens von Base 1023 bis 1887 (entspricht Base 2926951 bis 2927815 in Abb. 6-14 im Anhang) wurde aus der cDNA-Bibliothek von *A. fumigatus* B5233 über eine PCR mit den Primern *fgaOx1_for2* und *fgaOx1_rev2* amplifiziert (PCR-Ansatz und -Bedingungen siehe Kap. 2.3.6). Das 887 bp lange PCR-Produkt wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert (pMM010) und das 905 bp lange *EcoRI*-DNA-Fragment mittels Restriktionsverdau nachgewiesen (Laufspur 3).

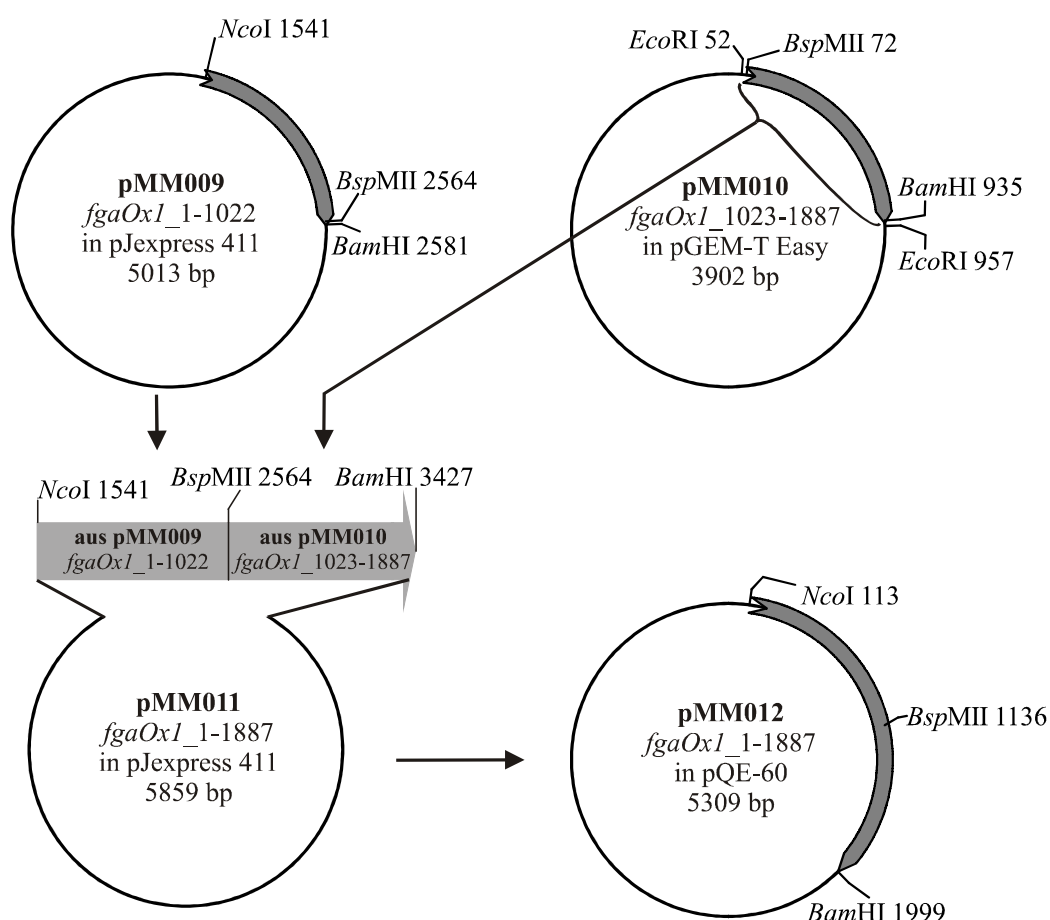
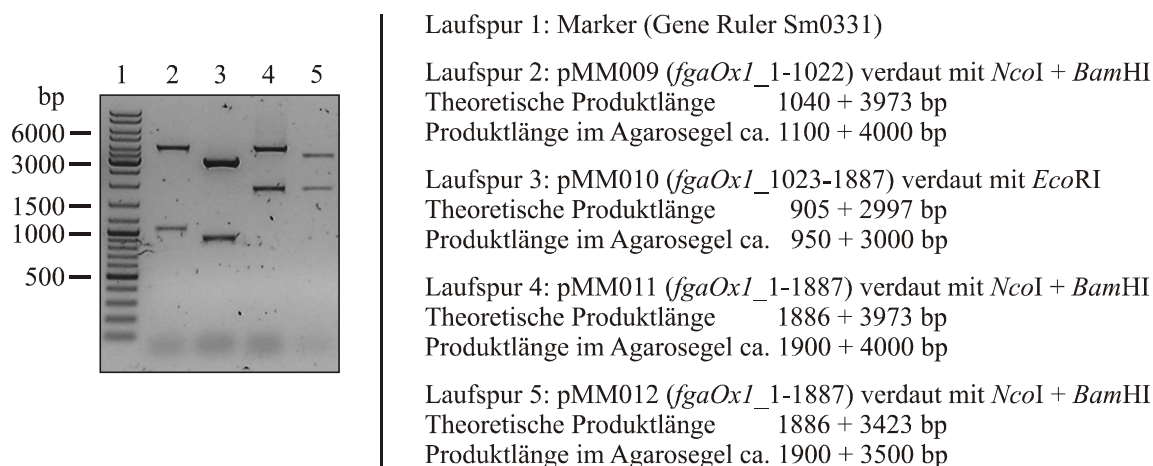


Abb. 3-13: 1 %iges Agarosegel mit Klonierungsschritten zur Erstellung des Plasmids pMM012 und die zugehörigen Vektorkarten von pMM009 bis pMM012.

Das Plasmid wurde nach der Sequenzierung als pMM010 bezeichnet und anschließend mit den Restriktionsenzymen *Bsp*MII und *Bam*HI verdaut. Das DNA-Fragment (863 bp) wurde über eine Gelextraktion aufgereinigt (Kap. 2.3.4.1) und in das ebenfalls mit *Bsp*MII und *Bam*HI verdaute Plasmid pMM009 ligiert. Durch die Ligation wurde das Plasmid pMM011 erhalten (Abb. 3-13), aus dem das vollständige, putative Gen *fgaOx1* (1886 bp) über die Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Bam*HI in den Expressionsvektor pQE-60 umkloniert wurde. Dadurch entstand das Expressionsplasmid pMM012 (Abb. 3-13).

Das Plasmid pMM012 wurde mittels Hitzeschock-Transformation in *CaCl*₂-kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen eingebracht. Die Abb. 3-14 zeigt die SDS-PAGE einer Aufreinigung des Proteins nach der Kultivierung bei 37 °C in 1 l TB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 und Induktion mit 0,1 mM IPTG für 8 h bei 37 °C. Das theoretische Molekulargewicht von FgaOx1-His₆ wurde mit 71 kDa berechnet. Vergleicht man die Laufspur 1 mit den Laufspuren 2 und 4, so konnte keine Bande für FgaOx1-His₆ oberhalb der 66 kDa-Bande des Proteingrößenstandards beobachtet werden. Die Laufspur 5 enthielt jedoch eine Proteinbande bei ca. 66 kDa. Zur Beurteilung, ob es sich bei dieser Proteinbande um das Protein FgaOx1-His₆ handelt, wurde eine Aufreinigung mit dem leeren pQE-60 Vektor in XL1-Blue-Zellen als Negativkontrolle durchgeführt (Laufspur 6). Der Vergleich zwischen Laufspur 5 und 6 zeigt, dass die 66 kDa-Bande auch in der Negativkontrolle vorhanden war und daher nicht von dem Protein FgaOx1-His₆ stammen konnte.

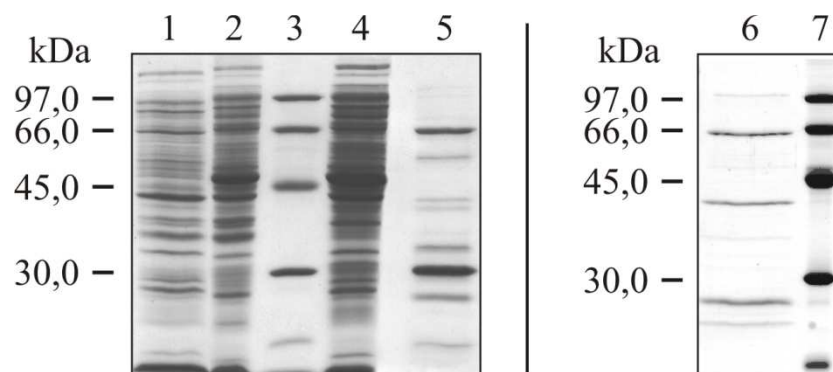


Abb. 3-14: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von FgaOx1-His₆ (pMM012) in *E. coli* XL1-Blue. Spur 1: Expressionsstatus vor der Induktion, Spur 2: Gesamtprotein nach 15 h Induktion, Spur 3 und 7: Proteingrößenstandard, Spur 4: Löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 5: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose, Spur 6: Reinigungsgrad der Negativkontrolle (*E. coli* XL1-Blue) nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose.

Die Tab. 3-5 listet weitere getestete Expressionsbedingungen von *fgaOx1* (pMM012) in *E. coli* XL1-Blue bzw. in *E. coli* M15 auf. Die Analysen der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE zeigten vergleichbare Ergebnisse zu Abb. 3-14.

Tab. 3-5: Getestete Expressionsbedingungen von *fgaOx1* (pMM012) in *E. coli* XL1-Blue bzw. in *E. coli* M15 (*).

Medium	Kultivierung vor Induktion	Induktion	Kultivierung nach Induktion
100 ml LB	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	1 mM IPTG	37 °C für 1 h bzw. 2 h
100 ml LB	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	1 mM IPTG	37 °C für 5 h
100 ml LB	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	1 mM IPTG	37 °C üN
100 ml LB	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	2 mM IPTG	37 °C üN
100 ml LB	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	0,1 mM IPTG	37 °C üN
100 ml LB	22 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	0,1 mM IPTG	22 °C für 10 h
100 ml LB + FMN	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	0,2 mM IPTG	37 °C für 3 h
100 ml LB + FAD	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	0,2 mM IPTG	37 °C für 3 h
1000 ml LB	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,4	1 mM IPTG	37 °C für 5 h
1000 ml LB	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	1 mM IPTG	22 °C üN
1000 ml LB	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	1 mM IPTG	4 °C üN
100 ml TB	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	1 mM IPTG	37 °C für 5 h
100 ml TB	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	0,1 mM IPTG	37 °C für 4 h
100 ml TB	22 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	0,1 mM IPTG	22 °C für 10 h
1000 ml TB	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	1 mM IPTG	37 °C üN
1000 ml TB	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	5 µM IPTG	22 °C üN
1000 ml TB*	37 °C bis OD ₆₀₀ 0,6	0,1 mM IPTG	22 °C üN

3.2.5.2 Klonierung und Expression von *fgaOx1* in *E. coli* BL21(DE3)

Da die Expressionstests mit dem Konstrukt pMM012 zu keiner nachweisbaren Überexpression führten, wurde ein weiteres Expressionskonstrukt erstellt, bei dem der Expressionsvektor pJexpress411 verwendet wurde. Dieser besitzt im Gegensatz zum T5-Promoter des Vektors pQE-60 einen T7-Promotor. Das Plasmid pMM011 (Abb. 3-13) enthielt bereits das vollständige *fgaOx1*-Gen im Expressionsvektor pJexpress411 und verfügte zusätzlich über einen N-terminalen Histidin-tag. Es fehlte jedoch das Stoppcodon am Ende des Gens, da das Plasmid pMM011 für die Klonierung in den Expressionsvektor pQE-60 verwendet wurde.

Daher wurde das Stoppcodon über ein synthetisiertes, selbstkomplementäres Oligonukleotid (*fgaOx1*_Stopp) hinter die *Bam*HI-Schnittstelle in das Plasmid pMM011 eingefügt. Das Oligonukleotid wurde durch Erhitzen und schrittweises Abkühlen in ein doppelsträngiges DNA-Fragment mit den beiden *Bam*HI-Überhängen überführt (Abb. 3-15). Durch die Ligation des 18 bp langen Oligonukleotids in das Plasmid pMM011 konnte das Plasmid pMM013 erhalten werden, in dem das Gen *fgaOx1* nun ein Stoppcodon besaß. Das Plasmid pMM013 konnte über einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *Xho*I auf das Vorhandensein des Oligonukleotids überprüft werden (Abb. 3-15). Die *Xho*I-Schnittstelle existierte nicht in dem Plasmid pMM011, jedoch enthielt das Oligonukleotid die entsprechende DNA-Sequenz. Der

Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I (Abb. 3-15) zeigte daher nur das Fragment mit einer Länge von 1895 bp, wenn das Oligonukleotid in den Vektor ligiert wurde.

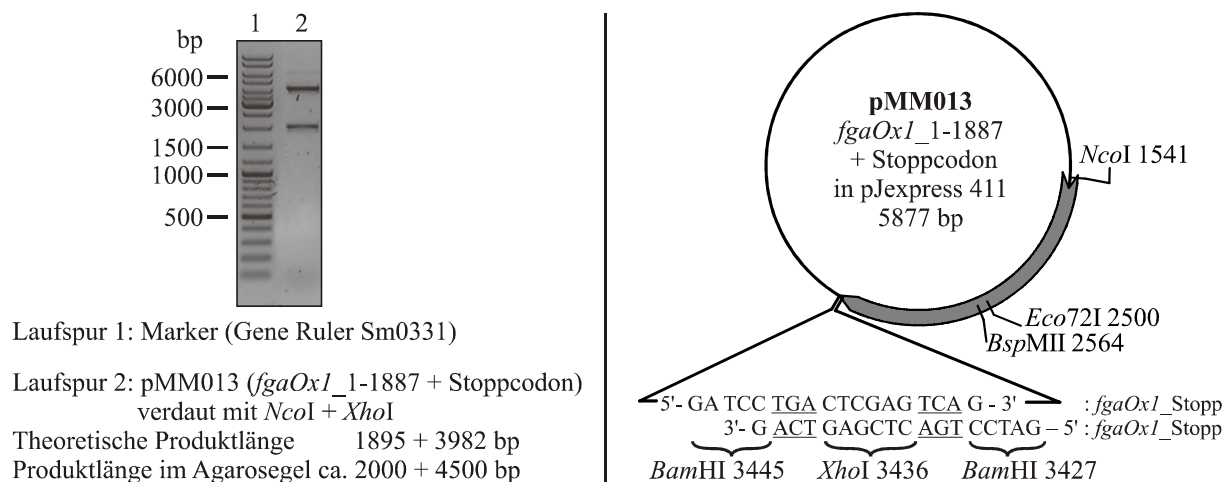


Abb. 3-15: 1 %iges Agarosegel mit dem Plasmid pMM013 und der zugehörigen Vektorkarte. Die beiden eingefügten Stoppcodons im dem Oligonukleotid *fgaOx1*_Stopp wurden unterstrichen.

Die Abb. 3-16 zeigt die SDS-PAGE zu der Aufreinigung von pMM013 in *E. coli* BL21(DE3). Die Zellen wurden bei 37 °C in 1 l LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Anschließend erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG für 2 h bei 37 °C. Das theoretische Molekulargewicht von His₆-FgaOx1 wurde auf 71 kDa berechnet. In den Laufspuren 1, 2 und 4 konnte allerdings keine deutliche Überexpression einer Bande von His₆-FgaOx1 oberhalb der 66 kDa-Bande des Proteingrößenstandards beobachtet werden. Die Laufspur 5 nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose zeigte jedoch eine Proteinbande oberhalb der 66 kDa-Bande des Proteingrößenstandards. Diese Bande wurde jedoch auch mit der Negativkontrolle, der Aufreinigung von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen unter den zuvor genannten Expressionsbedingungen (Laufspur 6), erhalten.

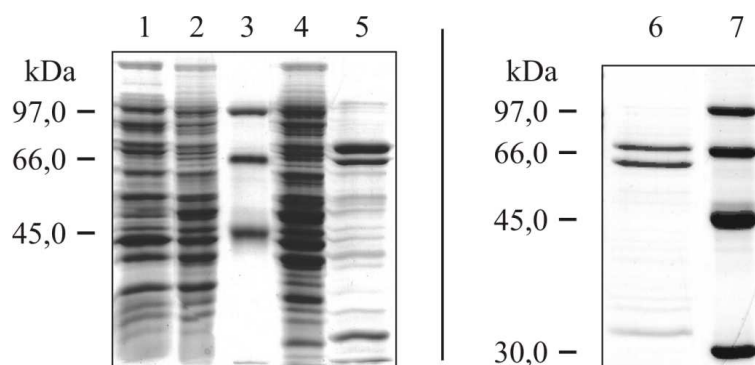


Abb. 3-16: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von His₆-FgaOx1 (pMM013) in *E. coli* BL21(DE3). Spur 1: Expressionsstatus vor der Induktion, Spur 2: Gesamtprotein nach 15 h Induktion, Spur 3 und 7: Proteingrößenstandard, Spur 4: Löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 5: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose, Spur 6: Reinigungsgrad der Negativkontrolle (*E. coli* BL21(DE3)) nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose.

3.2.5.3 Klonierung und Expression von *fgaOx1* in *S. cerevisiae*

Da alle vorherigen Expressionstests mit unterschiedlichen Expressionskonstrukten in verschiedenen *E. coli*-Stämmen zu keinen Ergebnissen führten, wurde als nächster Schritt die Expression von *fgaOx1* in *S. cerevisiae* durchgeführt. Die Abb. 3-17 gibt die Klonierungsschritte zur Erstellung des Expressionsplasmids pMM016 mit den zugehörigen Vektorkarten wieder.

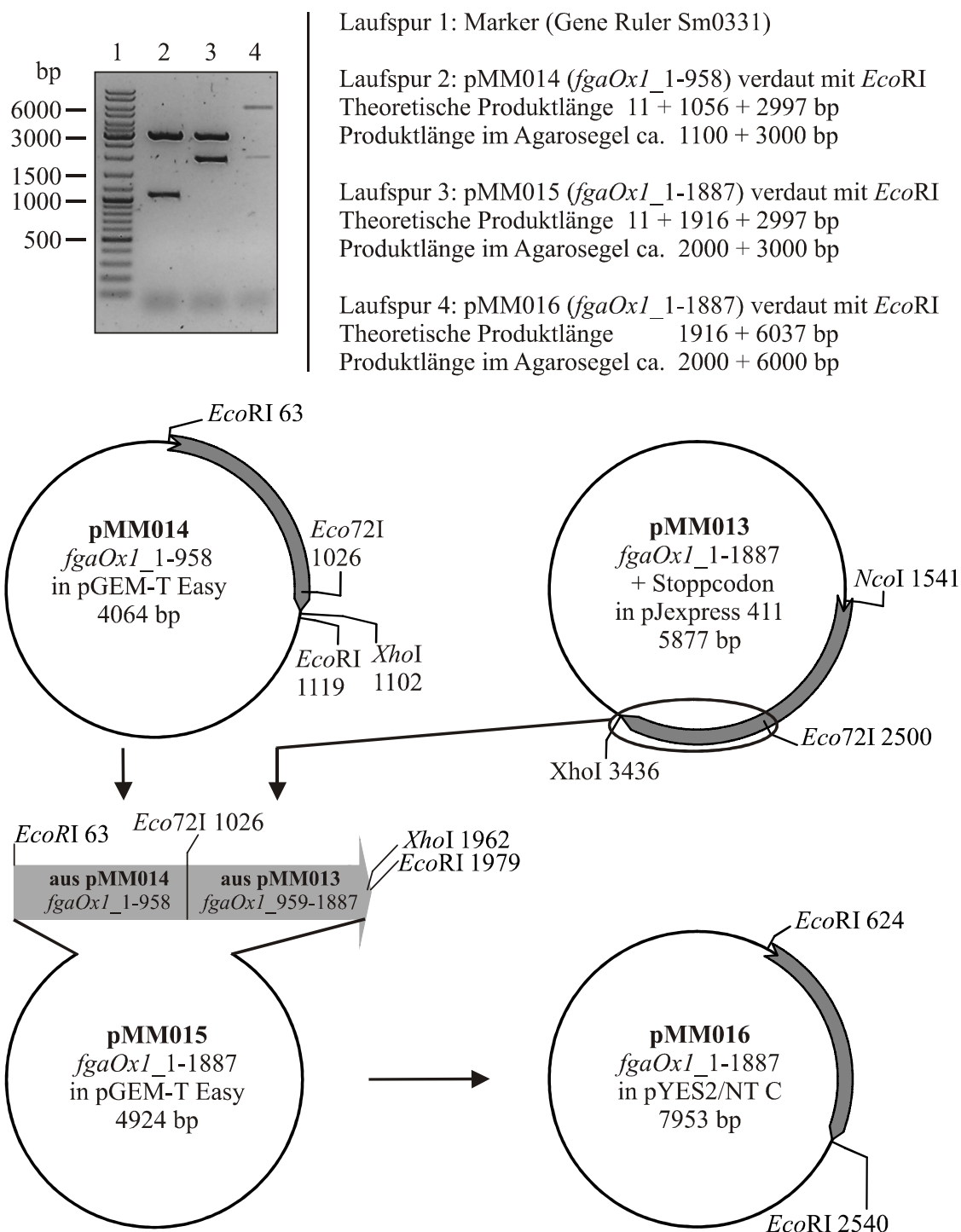


Abb. 3-17: 1 %iges Agarosegel mit den Klonierungsschritten zur Erstellung des Plasmids pMM016 und die zugehörigen Vektorkarten von pMM014, pMM015 und pMM016.

Zunächst wurden die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI* für die Klonierung in den Expressionsvektor pYES2/NT C mittels PCR (Kap. 2.3.6) in das Gen *fgaOx1* eingefügt. Dazu wurde das Plasmid pMM009 als *template* verwendet und *fgaOx1*_1-958 mit den Primern *fgaOx1_for3* und *fgaOx1_rev3* amplifiziert. Das erhaltene 1049 bp lange PCR-Produkt wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert, wodurch das Plasmid pMM014 entstand (Abb. 3-17). Als nächster Schritt wurde über die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* ein 936 bp DNA-Fragment aus dem Plasmid pMM013 (Abb. 3-15) in das Plasmid pMM014 ein-kloniert. Dadurch wurde das Plasmid pMM015 erhalten (Abb. 3-17), in dem das vollständige *fgaOx1*-Gen mit Stoppcodon vorhanden war. Über einen Verdau von pMM015 mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* wurde das *fgaOx1*-Gen in den Expressionsvektor pYES2/NT C umkloniert. Das Expressionskonstrukt (pMM016) (Abb. 3-17) besaß einen N-terminalen Histidin-*tag*.

Nach der Transformation von chemisch kompetenten *S. cerevisiae* INVSc-1-Zellen mit dem Plasmid pMM016 (Kap. 2.3.7.2) erfolgte ein Expressionstest bei 30 °C in SC-Medium mit der Induktion durch 2 % Galaktose für 15 h bei 30 °C (Kap. 2.4.1.2). Die Abb. 3-18 zeigt die SDS-PAGE zu der Aufreinigung. Das theoretische Molekulargewicht von His₆-FgaOx1 (pMM016) wurde auf 74 kDa berechnet. Die Laufspuren 2 bis 6 zeigten jedoch keine Proteinbande in diesem Bereich.

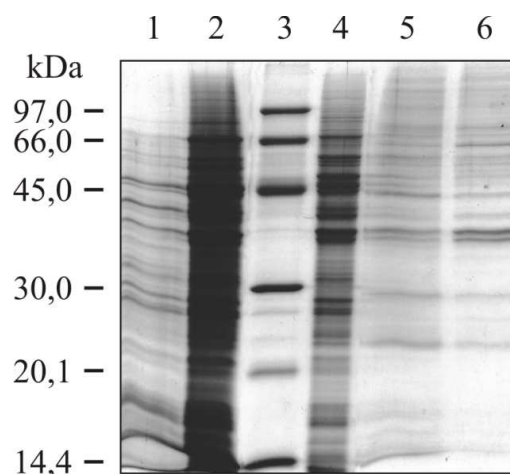


Abb. 3-18: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von His₆-FgaOx1 (pMM016) in *S. cerevisiae*. Spur 1: Expressionsstatus vor der Induktion, Spur 2: Gesamtprotein nach 15 h Induktion, Spur 3: Proteingrößenstandard, Spur 4: Löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 5: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose 1. ml, Spur 6: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose 2. ml.

3.2.5.4 Klonierung und Expression von *fgaOx1*Δ1-402

Da weder die Expression von *fgaOx1* in *E. coli* noch in *S. cerevisiae* zu einem Erfolg führten, wurde ein detaillierter Proteinsequenzvergleich von FgaOx1 aus *A. fumigatus* mit dem orthologen Protein EasE aus *C. purpurea* P1 durchgeführt. Dieser zeigte, dass FgaOx1 aus *A. fumigatus* N-terminal 135 zusätzliche Aminosäuren enthält. Wie zuvor beschrieben

(Kap. 3.2.5.1) konnte das vollständige *fgaOx1*-Gen (pMM008) nicht aus der cDNA von *A. fumigatus* B5233 amplifiziert werden. Des Weiteren ergab die FGENESH-Analyse von *fgaOx1* (Kap. 3.2.5.1) Unterschiede im Anfangsbereich des Gens im Vergleich zur NCBI-Datenbanksequenz. Daher bestand die Möglichkeit, dass die Gensequenz der NCBI-Datenbank falsch ist. Aus diesem Grund wurde der Primer *fgaOx1_for2* entwickelt, mit dem die ersten 134 Aminosäuren von FgaOx1 in Analogie zur Proteinsequenz von EasE aus *C. purpurea* deletiert wurden.

Mit den Primern *fgaOx1_for2* und *fgaOx1_rev* wurde aus dem Plasmid pMM010 ein PCR-Produkt (1502 bp) des verkürzten *fgaOx1*-Gens (*fgaOx1*Δ1-402) amplifiziert (Kap. 2.3.6). Nach der erfolgreichen Ligation des PCR-Produkts in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy (pMM018) (Abb. 3-19) wurde das 1487 lange DNA-Fragment (*fgaOx1*Δ1-402) mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BamHI* in den Expressionsvektor pQE-60 umkloniert. Das Expressionsplasmid wurde als pMM019 bezeichnet (Abb. 3-19).

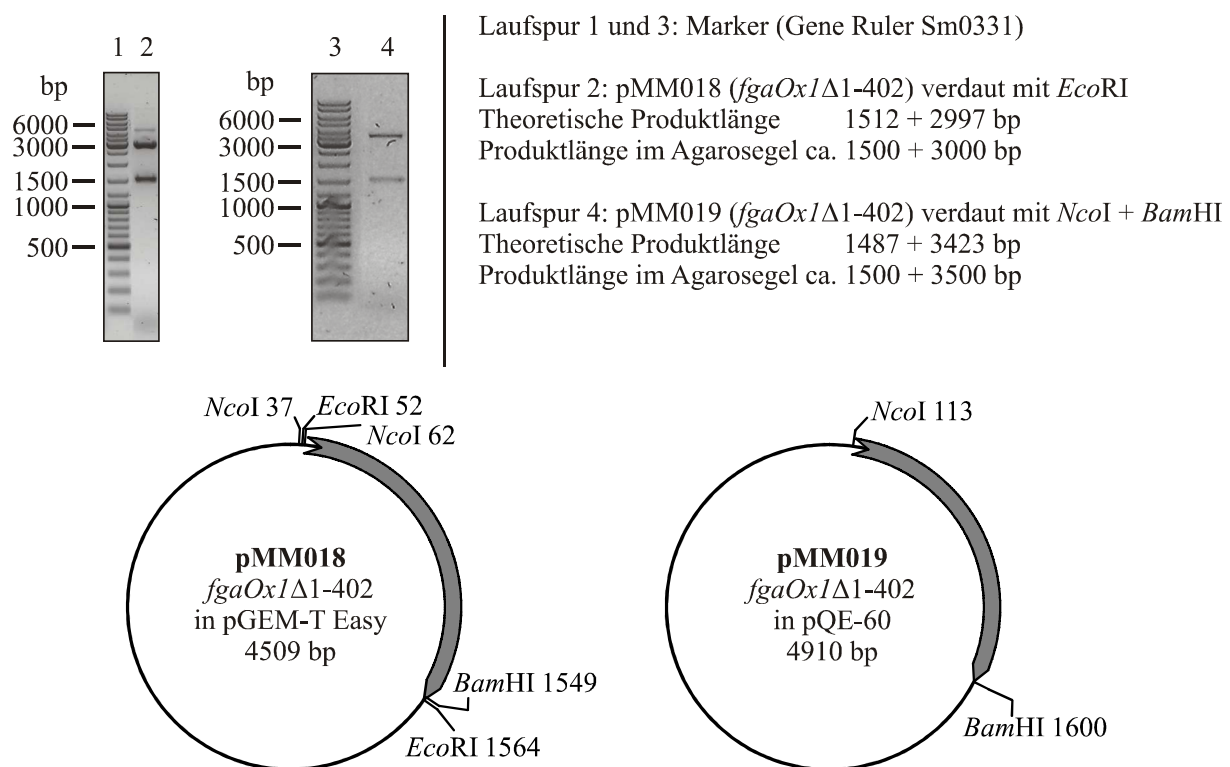


Abb. 3-19: 1 %iges Agarosegel mit den Plasmiden pMM018 und pMM019 und die zugehörigen Vektorkarten.

Das Plasmid pMM019 wurde mittels Hitzeschock-Transformation in *CaCl*₂-kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen eingebracht und exprimiert. Die Abb. 3-20 zeigt die SDS-PAGE zu der Aufreinigung nach der Kultivierung bei 37 °C in 1 l TB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 und Induktion mit 0,1 mM IPTG für 15 h bei 22 °C. Das theoretische Molekulargewicht von FgaOx1-His₆ wurde auf 56 kDa berechnet. Eine Proteinbande zwischen der

66 kDa- und 45 kDa-Bande des Proteingrößenstandards wurde jedoch nicht beobachtet (Abb. 3-20, Laufspur 1).

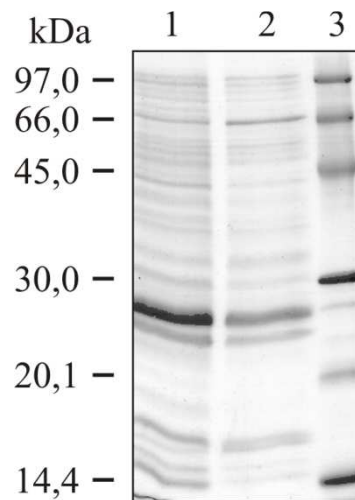


Abb. 3-20: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von FgaOx1Δ1-402-His₆ (pMM019) in *E. coli* XL1-Blue. Spur 1: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose 1. ml, Spur 2: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose 2. ml, Spur 3: Proteingrößenstandard.

Zeitgleich mit den Expressionsversuchen von *easE* aus *C. purpurea* wurde erneut versucht, den ersten Teil von *fgaOx1* (*fgaOx1*_1-1022) aus der cDNA von *A. fumigatus* B5233 zu amplifizieren, um eine Sequenzbestätigung des NCBI-Datenbankeintrags zu erhalten. Die Amplifikation war in diesem Fall erfolgreich und es wurde ein 1037 bp langes PCR-Produkt (Kap. 2.3.6) mit den Primern *fgaOx1*_for und *fgaOx1*_rev4 erhalten, das in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert wurde (pMM017, Abb. 3-21). Da sich die Sequenz der NCBI-Datenbank durch Sequenzierung des Plasmids pMM017 bestätigte, erfolgten keine weiteren Expressionstests mit dem Plasmid pMM019.

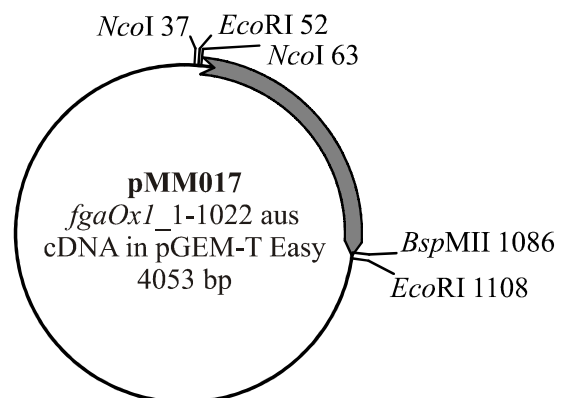


Abb. 3-21: Vektorkarte des Plasmids pMM017 mit *fgaOx1*_1-1022 aus cDNA.

Weiterführende bioinformatische Untersuchungen der Proteinsequenz von FgaOx1 ergaben, dass möglicherweise zwei Membrandomänen (Anhang Abb. 6-47) vorhanden sind. Daher könnten in nachfolgenden Arbeiten erneute Expressionsversuche von *fgaOx1* mit anschließender Optimierung der Aufreinigung im Hinblick auf ein Membranprotein durchgeführt werden (siehe auch Kap. 4.3).

3.2.6 Klonierung und Expression von *easE* aus *C. purpurea*

Da alle Expressionsversuche von *fgaOx1* aus *A. fumigatus* B5233 erfolglos blieben und sich die NCBI-Sequenz aus cDNA bestätigen ließ, wurden die Expression des Homologs *easE* aus *C. purpurea* P1 durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Isolierung der mRNA von *C. purpurea* P1, die in cDNA umgeschrieben wurde (Kap. 2.3.1). Anschließend wurde das Gen mittels PCR mit den Primern *easE_for* und *easE_rev* (Kap. 2.1.4) amplifiziert. Das PCR-Produkt (1458 bp) wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy ligiert. Das erhaltene Plasmid pMM020 (Abb. 3-22) wurde sequenziert, wobei die Sequenz dem NCBI-Eintrag AJ011965 von *easE* aus *C. purpurea* P1 entsprach. Daher erfolgte die Umklonierung des 1333 bp langen DNA-Fragments aus pMM020 in den Expressionsvektor pQE-60 über die Restriktionsenzyme *NcoI* und *BglIII*. Die Umklonierung ergab das Plasmid pMM021 (Abb. 3-22), mit dem die Expression in *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen erfolgte.

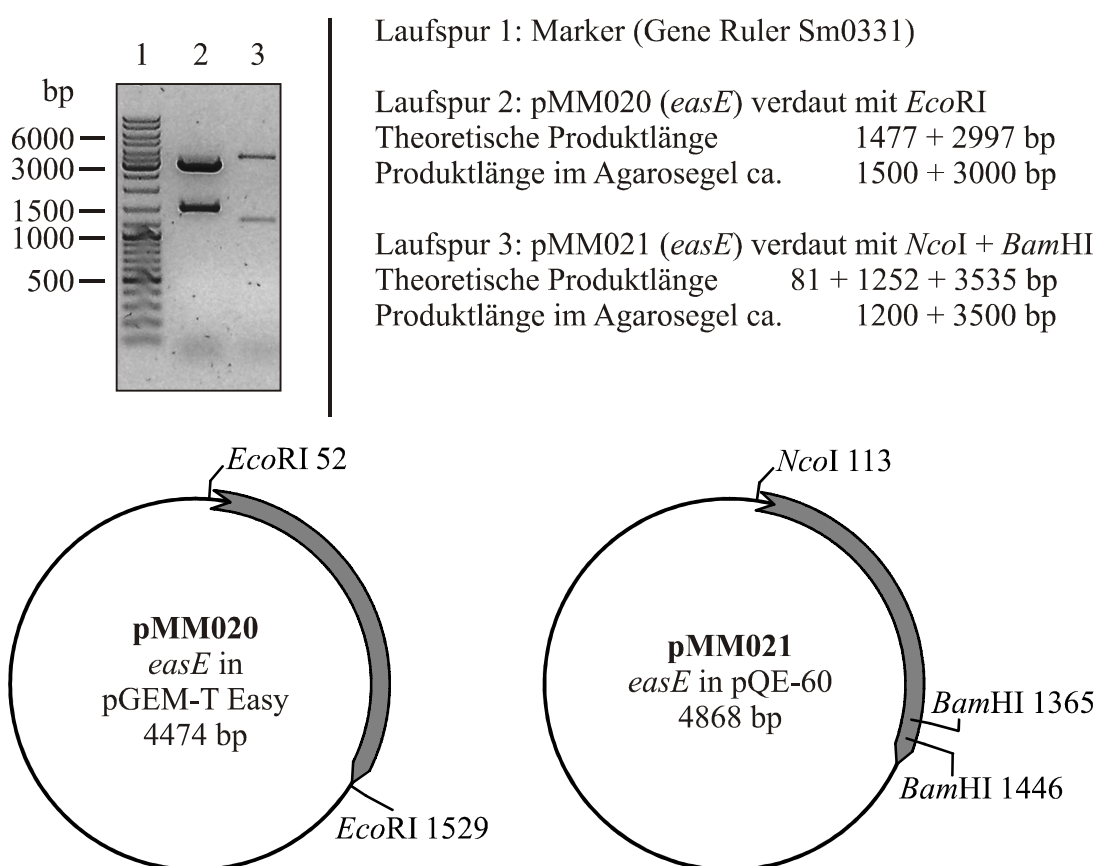


Abb. 3-22: 1 %iges Agarosegel mit den Plasmiden pMM020 und pMM021 und die zugehörigen Vektorkarten.

Die Abb. 3-23 zeigt die SDS-PAGE zu der Aufreinigung nach der Kultivierung bei 37 °C in 1 l TB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,7 und Induktion mit 0,1 mM IPTG für 15 h bei 22 °C. Eine zusätzliche Proteinbande im Bereich des theoretischen Molekulargewichts von EasE-His₆ (53 kDa) konnte jedoch nicht erkannt werden (Abb. 3-23, Laufspur 5). Ein weiterer Expressionstest von *easE* (pMM021) erfolgte in *E. coli* M15-Zellen. Auch in diesem *E. coli*-

Stamm konnte keine Expression detektiert werden. Es erfolgten keine weiteren Expressionstests, da während der Genomanalyse der 23 Ascomyceten neue Erkenntnisse über das Gen *fgaOx1* bzw. *easE* gewonnen wurden (siehe auch Kap. 4.3).

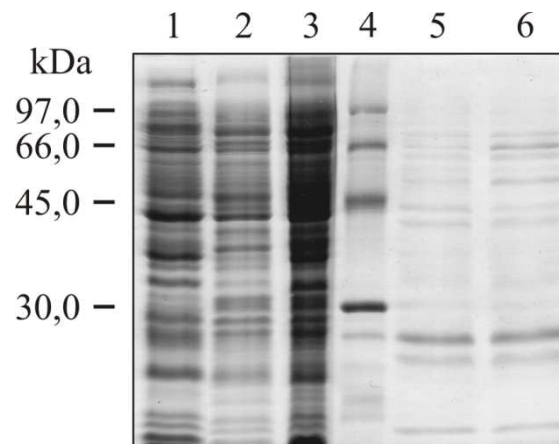


Abb. 3-23: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von EasE-His₆ (pMM021) in *E. coli* XL1-Blue. Spur 1: Expressionsstatus vor der Induktion, Spur 2: Gesamtprotein nach 15 h Induktion, Spur 3: Löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 4: Proteingrößenstandard, Spur 5: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose 1. ml, Spur 6: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose 2. ml.

Die Analyse der Intron-Exon-Struktur und der Vergleich von 20 orthologen *fgaOx1*-Gensequenzen mit *fgaOx1* von *A. fumigatus* Af293 und *easE* von *C. purpurea* zeigten, dass die Gensequenz von *easE* aus der NCBI-Datenbank sehr wahrscheinlich falsch vorhergesagt wird. Die Abb. 6-15 (Anhang) zeigt einen Multi-Proteinsequenzvergleich von FgaOx1 aus *A. fumigatus* Af293 mit EasE aus *C. purpurea* P1 und der neuen putativen EasE-Proteinsequenz. Der Vergleich zeigt, dass EasE von *C. purpurea* P1 nach der NCBI-Datenbank N-terminal 112 Aminosäuren fehlen. Die neue Proteinsequenz von EasE, die in dieser Arbeit vorgeschlagen wurde, besitzt ähnlich wie FgaOx1 einen längeren N-Terminus. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Längen der N-Termini der Orthologen von FgaOx1 wird in Kap. 4.3 diskutiert. Ein Beleg für die Richtigkeit der neuen EasE-Sequenz ist die Tatsache, dass für alle 22 identifizierten, putativen *fgaOx1*-Gene eine vergleichbare Intron-Exon-Struktur gefunden wurde. Dies zeigt auch der Multi-Proteinsequenzvergleich in Abb. 6-3 (Anhang).

3.2.7 Klonierung und Expression von *easG* und *easA* aus *C. purpurea*

Die Gene *easG* und *easA* aus *C. purpurea* P1 bestanden nach den NCBI-Einträgen AY836771 bzw. AJ703809 aus drei Exons bzw. einem Exon. Die zugehörigen Proteine EasG und EasA wiesen 290 bzw. 369 Aminosäuren auf, wodurch sich ein theoretisches Molekulargewicht von 32 bzw. 42 kDa ergab. Beide Gene wurden anhand ihrer mRNA-Sequenzen chemisch synthetisiert (MWG). Zuvor wurde eine Codon-Optimierung für die Expression in *E. coli* durchge-

führt. Für die spätere Klonierung in den Expressionsvektor pQE-60 wurde bei beiden Genen eine *Nco*I-Restriktionsschnittstelle über das Startcodon eingefügt und das Stoppcodon mit Hilfe einer *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle mutiert. Das Gen *easG* (878 bp) wurde von der Firma MWG in den Klonierungsvektor pCR2.1 kloniert (pMM043 Abb. 3-24). Die Umklonierung des 872 bp langen DNA-Fragments in den Expressionsvektor pQE-60 resultierte in dem Plasmid pMM0044 (Abb. 3-24). *EasA* hingegen wurde von MWG in den Klonierungsvektor pBluescript II SK (+) ligiert (pMM045) (Abb. 3-25). Das über die Restriktionsenzyme *Nco*I und *Bam*HI erhaltene DNA-Fragment (1109 bp) wurde in den Expressionsvektor pQE-60 ligiert, so dass das Plasmid pMM046 erhalten wurde (Abb. 3-25).

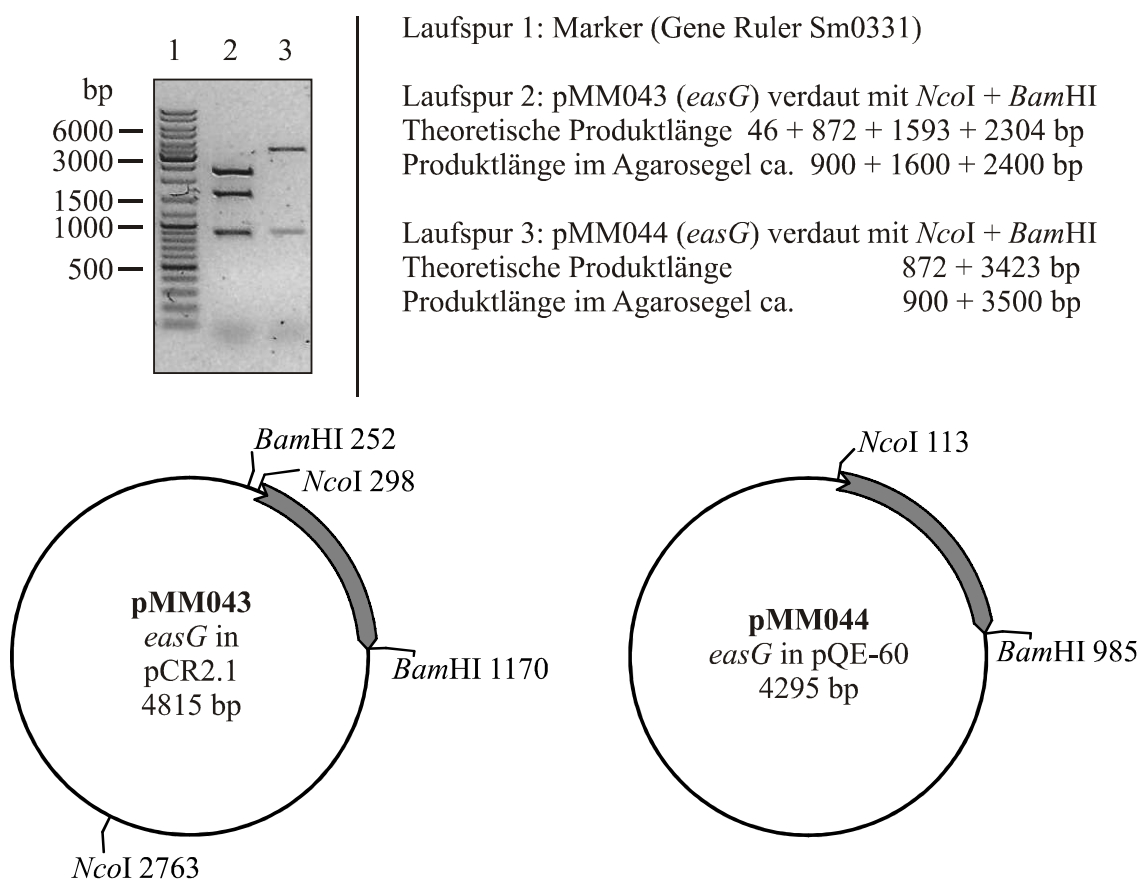


Abb. 3-24: 1 %iges Agarosegel mit den Plasmiden pMM043 und pMM044 und die zugehörigen Vektorkarten.

Beide Plasmide wurde mittels Hitzeschock-Transformation in CaCl_2 -kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen eingebracht. Im Falle des *EasG*, das in der SDS-PAGE oberhalb der 30 kDa-Bande des Proteingrößenstandards lief (Abb. 3-26, Laufspur 9), wurden die Expressionsbedingungen bis zu einer Proteinausbeute von 3,4 mg/l Kultur optimiert. Hierzu wurden die Zellen bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert und die Expression für 15 h bei 26 °C mit 0,1 mM IPTG induziert.

Während der Aufreinigung von EasG nach dem Standard-Protokoll (Kap. 2.4.2) wurden 100 µl Ni-NTA-Agarose pro Liter Kultur verwendet. Der Vergleich zwischen Laufspur 7 und 8 zeigt, dass trotz der relativ niedrigen Temperatur nach der Induktion ein großer Teil des EasG-His₆ unlöslich blieb. Für das unterhalb der 45 kDa-Bande des Proteingrößenstandards laufende EasA (Abb. 3-26) wurden die Expressionsbedingungen bis zu einer Proteinausbeute von 1 mg/l Kultur optimiert. Die Zellen wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert und die Expression für 15 h bei 22 °C mit 0,1 mM IPTG induziert. Während der Aufreinigung nach dem Standard-Protokoll wurden 85 µl Ni-NTA-Agarose pro Liter Kultur verwendet. Der Vergleich zwischen Laufspur 2 und 3 (Abb. 3-26) zeigt, dass auch bei dem EasA-His₆ ein Teil des Proteins unlöslich blieb.

Die Analyse verschiedener Reaktionsansätze zeigte, dass das aufgereinigte EasA inaktiv war, EasG jedoch Aktivität besaß (Kap. 3.6.1). Daher wurde nach der Ursache für die Inaktivität von EasA gesucht. Es wurden zunächst andere *E. coli*-Stämme getestet, z.B. der Stamm M15. Außerdem wurden verschiedene pH-Werte der Pufferlösungen für die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose getestet. Zudem wurde eine Aufreinigung unter Zugabe von PMSF im Lysepuffer durchgeführt, um zu untersuchen, ob der Aktivitätsverlust durch Proteasen hervorgerufen wird. Auch eine Zugabe von FMN in den Lysepuffer wurde getestet, da FMN dem Ortholog FgaOx3 als Kofaktor dient. Anschließend wurden Aufreinigungen unter Zusatz von 2-Mercaptoethanol durchgeführt, um die im Protein vorhandenen vier Cysteinreste vor einer Oxidation zu schützen. Alle Bemühungen führten jedoch zu keiner messbaren EasA-Aktivität.

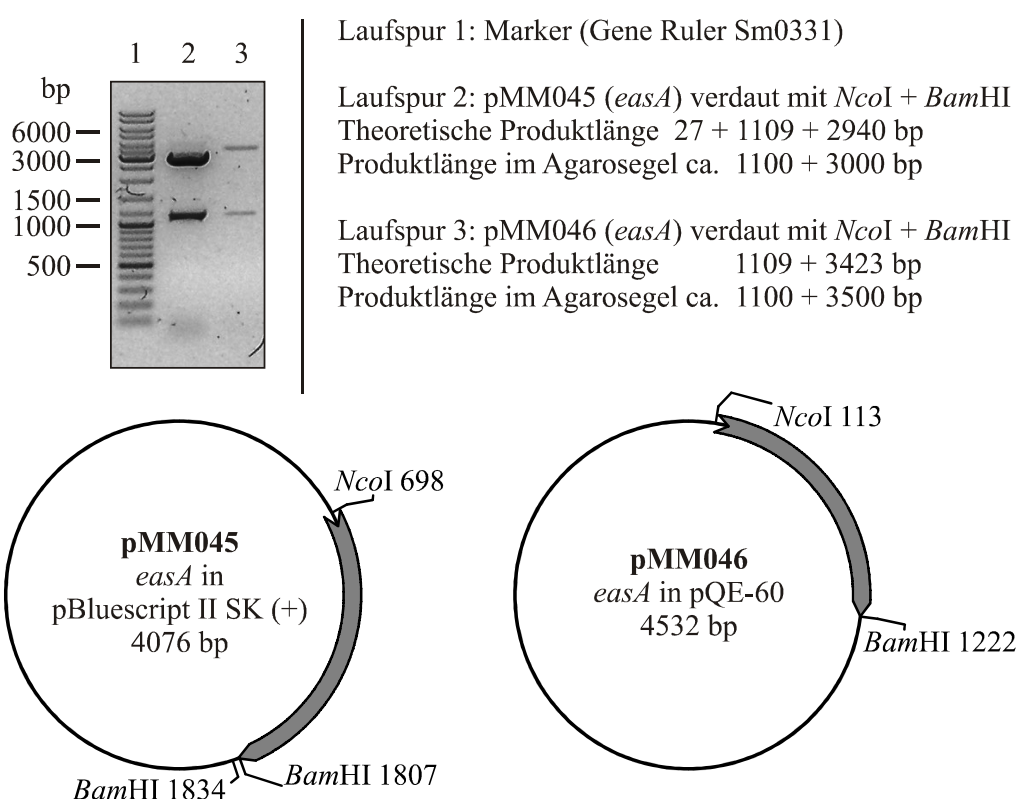


Abb. 3-25: 1 %iges Agarosegel mit den Plasmiden pMM045 und pMM046 und die zugehörigen Vektorkarten.

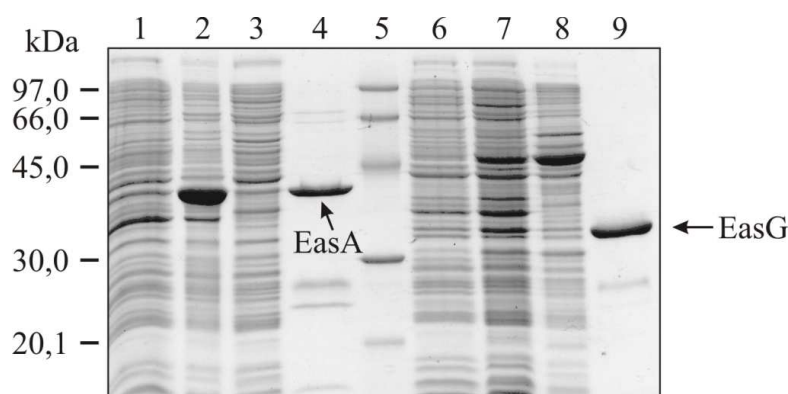


Abb. 3-26: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von EasA-His₆ (pMM046) (Laufspur 1 bis 4) und EasG-His₆ (pMM044) (Laufspur 6 bis 9) in *E. coli* XL1-Blue. Spur 1: Expressionsstatus vor der Induktion, Spur 2: Gesamtprotein nach 15 h Induktion, Spur 3: Löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 4: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose, Spur 5: Proteingrößenstandard, Spur 6: Expressionsstatus vor der Induktion, Spur 7: Gesamtprotein nach 15 h Induktion, Spur 8: Löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 9: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose.

3.2.8 Klonierung und Expression von *fgaFS_{pc}* und *fgaOx3_{pc}* aus *P. commune*

Vor der Klonierung der Gene *fgaFS_{pc}* und *fgaOx3_{pc}* aus *P. commune* NRRL2033 musste zunächst eine Analyse der Intron-Exon-Struktur der beiden Gene erfolgen. Die DNA-Sequenz des Genclusters stammte aus dem Cosmid 28D7, das in einer vorherigen Arbeit von Inge Unsöld erstellt wurde (Unsöld 2006). Für die Zuordnung der Intron-Exon-Struktur wurden Multi-Sequenzvergleiche mit den Sequenzen der orthologen Gene aus *A. fumigatus* und *C. purpurea* durchgeführt. Das gefundene putative *fgaFS_{pc}* enthielt drei Exons und das putative *fgaOx3_{pc}* ein Exon. Auch FgaFS und FgaOx3 bestanden aus drei Exons bzw. einem Exon. Die Gensequenzen von *fgaFS_{pc}* und *fgaOx3_{pc}* wurden innerhalb dieser Arbeit in der Genbank unter den Einträgen JQ085283 und JQ085282 hinterlegt. Die Abb. 6-16 und Abb. 6-17 (Anhang) zeigen die Multi-Sequenzvergleiche der jeweils drei orthologen Gene, die mit Hilfe des Programms ClustalW2 erstellt wurden. In beiden Multi-Sequenzvergleichen wurden die Proteinsequenzen von FgaFS_{pc} und FgaOx3_{pc} verwendet, die durch die Analyse der Intron-Exon-Struktur erhalten wurden.

Das Gen *fgaFS_{pc}* wurde anhand der mRNA-Sequenzen aus der Analyse chemisch synthetisiert und in den Klonierungsvektor pCR2.1 ligiert (MWG) (Abb. 3-27). Zuvor wurde bei dem Gen jedoch eine Codon-Optimierung für die Expression in *E. coli* durchgeführt. Außerdem wurde für die Klonierung in den Expressionsvektor pQE-60 eine *Nco*I-Restriktionsschnittstelle über das Startcodon eingefügt und das Stoppcodon mit Hilfe einer *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle mutiert. Die Umklonierung des Gens über diese beiden Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pQE-60 resultierte in dem Expressionskonstrukt pMM048 (Abb. 3-27).

Später erfolgte die Amplifikation des Gens aus zuvor hergestellter cDNA von *P. commune* NRRL2033. Dabei wurde das PCR-Produkt mit den Primern *fgaFS_{pc}_for* und *fgaFS_{pc}_rev*

(Kap. 2.4.2) amplifiziert und in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert. Das Konstrukt wurde als pMM051 bezeichnet. Die Sequenzierung des Gens in dem Plasmid pMM051 (Abb. 3-28) bestätigte die Sequenz und die Intron-Exon-Struktur des chemisch synthetisierten *fgaFS_{pc}* (pMM048).

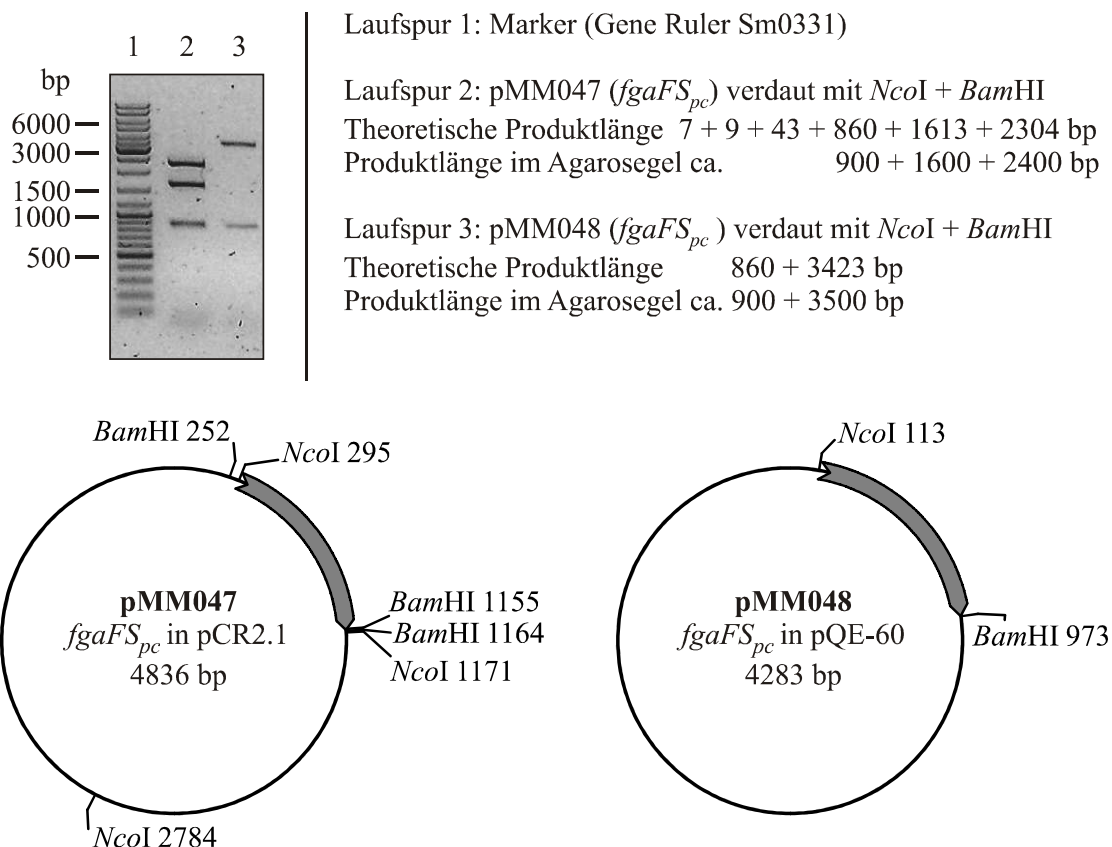


Abb. 3-27: 1 %iges Agarosegel mit den Plasmiden pMM047 und pMM048 und die zugehörigen Vektorkarten.

Mit dem Plasmid pMM048 in *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen erfolgte die Kultivierung bei 22 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 und einer Expression für 15 h bei 22 °C mit 0,1 mM IPTG. Bei den Aufreinigungen der verschiedenen Expressionsversuche zeigte sich jedoch, dass zwar das überproduzierte FgaFS_{pc}-His₆ in den Ni-NTA-Agarose-Elutionsfraktionen enthalten war, dieses aber sehr starke Verunreinigungen enthielt. Zur Reduzierung der Verunreinigungen wurde daher Kobalt-Resin anstelle der Ni-NTA-Agarose als Material zur Aufreinigung getestet.

In den Kobalt-Resin-Elutionsfraktionen konnten zwar die Verunreinigungen, die bei Verwendung der Ni-NTA-Agarose beobachtet wurden, entfernt werden, es ergaben sich aber neue

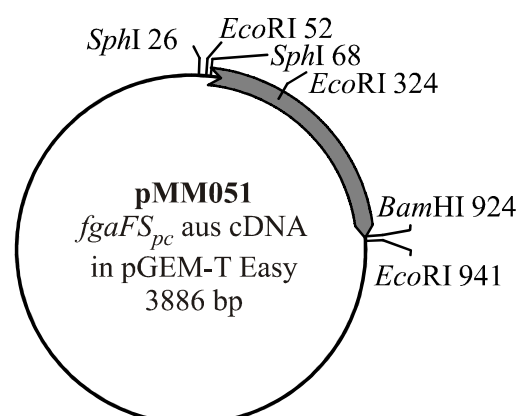


Abb. 3-28: Vektorkarte von pMM051 mit *fgaFS_{pc}* aus cDNA.

Verunreinigungen bei anderen Größen. Daher wurde eine Strategie unter aufeinander folgender Verwendung beider Materialien zur Aufreinigung des Proteins getestet. Die Abb. 3-29 zeigt die entsprechende SDS-PAGE zu der Aufreinigung von FgaFS_{pc}-His₆ (theoretisches Molekulargewicht: 33 kDa).

Die Laufspur 4 zeigt, dass die Kobalt-Resin-Elution bei Verwendung von 500 µl Kobalt-Resin pro Liter Kultur noch starke Verunreinigungen enthielt. Diese wurden durch den zusätzlichen Aufreinigungsschritt mit 50 µl Ni-NTA-Agarose pro Liter Kultur größtenteils entfernt, wodurch die Laufspur 5 fast nur noch das aufgereinigte Protein auf ungefähr der Höhe der 30 kDa-Bande des Proteingrößenstandards enthielt. Die umgekehrte Strategie unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose im ersten und Kobalt-Resin im zweiten Aufreinigungsschritt führte in Bezug auf die Reinheit des Proteins zu einem schlechteren Ergebnis. Bedingt durch den zusätzlichen Aufreinigungsschritt wurde eine relativ geringe Proteinausbeute von 50 µg/l Kultur erhalten.

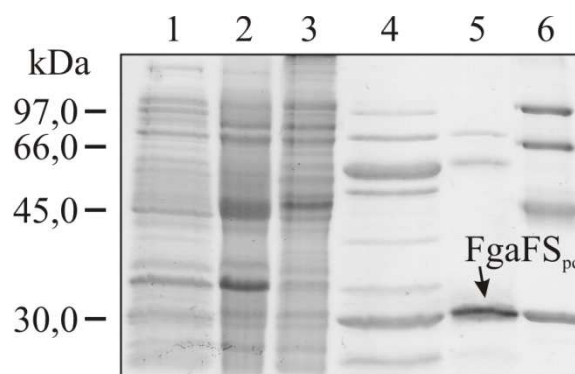


Abb. 3-29: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von FgaFS_{pc}-His₆ (pMM048) in *E. coli* XL1-Blue. Spur 1: Expressionsstatus vor der Induktion, Spur 2: Gesamtprotein nach 15 h Induktion, Spur 3: Löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 4: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung über Kobalt-Resin, Spur 5: Reinigungsgrad einer anschließenden Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose, Spur 6: Proteingrößenstandard.

Im Verlaufe der Optimierung der Aufreinigung von FgaFS_{pc}-His₆ wurde auch der Einsatz von Detergentien zur Verbesserung der Homogenität des Proteins getestet. Dabei wurden den Puffern (Kap. 2.4.2) 20 mM 2-Mercaptoethanol, 0,3 % *N*-Lauroylsarcosin, 2 % Triton X-100, 2 % Tween 20, 2 % IGEPAL (frühere Bezeichnung NP-40) bzw. 8 % Ethanol zugesetzt. Keinen detektierbaren Effekt hatte die Verwendung von 20 mM 2-Mercaptoethanol, während die Zugabe von 8 % Ethanol die Löslichkeit des Proteins verschlechterte. Die Verwendung von *N*-Lauroylsarcosin führte zu relativ sauberem Protein mit einer Ausbeute von 0,5 mg aus einem Liter Kultur. Da *N*-Lauroylsarcosin aber ein anionisches, denaturierendes Detergenz ist, war eine Renaturierung des aufgereinigten Proteins erforderlich. Hierbei wurde ein langsamer Pufferwechsel über Größenausschlusschromatographie (Kap. 2.4.3) sowie über Ultrafiltration (Kap. 2.4.3.1) getestet. Das aufgereinigte FgaFS_{pc}-His₆ wies jedoch keine detektierbare Aktivität auf. Von den drei getesteten, nicht-ionischen Detergentien (2 % Triton

X-100, 2 % Tween 20 und 2 % IGEPAL) wurden mit Tween 20 die besten Ergebnisse erzielt. Daher wurde dem Lysepuffer nach weiteren Tests 2 % Tween 20 zugesetzt, wodurch wahrscheinlich die Löslichkeit des FgaFS_{pc}-His₆ verbessert wurde und im Verhältnis insgesamt weniger Verunreinigungen in dem aufgereinigten Protein vorhanden waren. Die Aufreinigung von FgaFS_{pc}-His₆, dessen SDS-PAGE in Abb. 3-29 abgebildet ist, erfolgte bereits unter Verwendung von 2 % Tween 20 im Lysepuffer.

Da das Gen *fgaOx3_{pc}* keine Intron-Sequenzen enthielt, erfolgte eine direkte Amplifikation mittels PCR aus dem Cosmid 28D7. Hierzu wurden die beiden Primer *fgaOx3_{pc}_for* und *fgaOx3_{pc}_rev* verwendet (Kap. 2.1.4). Das 1150 bp lange PCR-Produkt wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert, wobei das Plasmid pMM049 entstand (Abb. 3-30). Das Gen (1135 bp) wurde anschließend über die Restriktionsschnittstellen *Sph*I und *Bam*HI in den Expressionsvektor pQE-70 umklont, der zuvor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten wurde. Das erhaltene Plasmid wurde als pMM050 bezeichnet (Abb. 3-30).

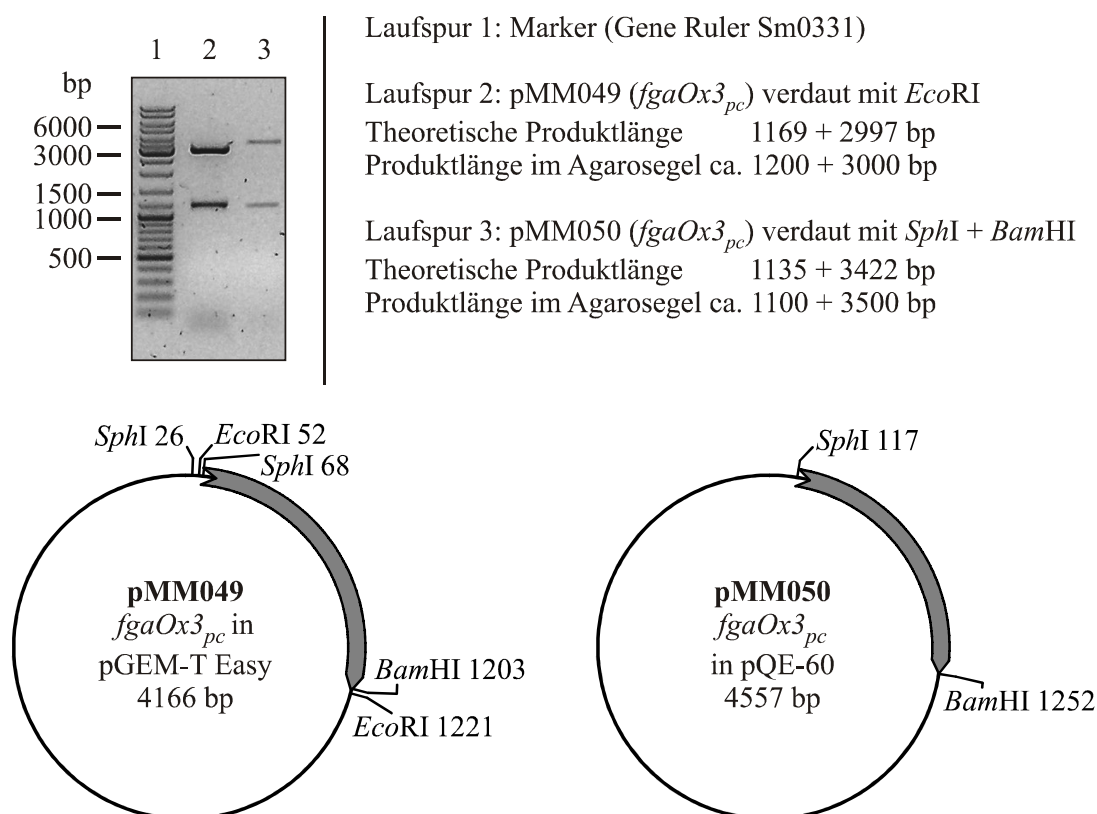


Abb. 3-30: 1 %iges Agarosegel mit den Plasmiden pMM049 und pMM050 und die zugehörigen Vektorkarten.

Die Abb. 3-31 zeigt die SDS-PAGE zu der Aufreinigung von FgaOx3_{pc}-His₆ (theoretisches Molekulargewicht: 43 kDa) in *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen unter den optimierten Bedingungen. Die Zellen wurden bei 22 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert und die Expression für 15 h bei 22 °C mit 0,1 mM IPTG induziert. Es wurde wie im Falle von FgaFS_{pc}-His₆ 2 % Tween 20 im Lysepuffer verwendet und eine Aufreinigungsstrategie mit Ni-NTA-Agarose und Kobalt-Resin genutzt, da sich auch für FgaOx3_{pc}-His₆ ähnliche Probleme mit der

Reinheit des Proteins ergaben. Im Unterschied zur Aufreinigung von FgaFS_{pc}-His₆ wurden für FgaOx3_{pc}-His₆ bessere Ergebnisse unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose im ersten und Kobalt-Resin im zweiten Aufreinigungsschritt erzielt. Die Laufspur 5 zeigt das aufgereinigte Protein unterhalb der 45 kDa-Bande des Proteingrößenstandards. Es wurde bei Zugabe von 88 µl Ni-NTA-Agarose und 100 µl Kobalt-Resin pro Liter Kultur eine Proteinausbeute von 50 µg/l Kultur erhalten.

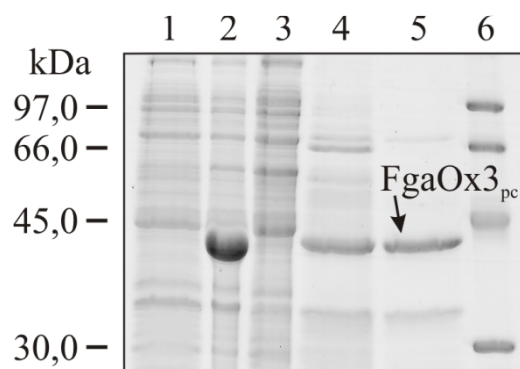


Abb. 3-31: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von FgaOx3_{pc}-His₆ (pMM050) in *E. coli* XL1-Blue. Spur 1: Expressionsstatus vor der Induktion, Spur 2: Gesamtprotein nach 15 h Induktion, Spur 3: Löslicher Proteinanteil nach der Zentrifugation, Spur 4: Reinigungsgrad nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose, Spur 5: Reinigungsgrad einer anschließenden Aufreinigung über Kobalt-Resin, Spur 6: Proteingrößenstandard.

3.3 Versuche zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von FtmO aus dem Biosynthesegencluster der Alkaloide vom Fumitremorgin-Typ

Ein durchgeführter Proteinsequenzvergleich von FtmO mit der NCBI-Datenbank ergab Homologien zu F-Box-Domänen und *Ankyrin repeat* Proteinen. In beiden Fällen ist bekannt, dass die Proteine Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Weitere Homologien zu anderen Proteinen mit bekannten Funktionen wurden nicht erhalten. Zunächst wurde vermutet, dass es sich bei dem Gen *ftmO* um eine Prenyltransferase handelt, die keine Homologien zu anderen Prenyltransferasen aufweist. Dabei wurde postuliert, dass FtmO Verruculogen zu Fumitremorgin A umsetzt (Kap. 1.6 Abb. 1-12). Daher wurden Reaktionsansätze mit 0,5 mM bzw. 1 mM Verruculogen unter Zugabe von 1 mM bzw. 2 mM DMAPP und 2,5 µg, 5 µg bzw. 10 µg FtmO inkubiert. Es wurden zudem jeweils 5 mM der Salze CaCl₂, CoCl₂, CuCl₂, FeSO₄, MgCl₂, MnCl₂, NiSO₂ und ZnSO₄ als mögliche Kofaktoren für FtmO getestet. Die Analyse der Reaktionsansätze erfolgte mittels HPLC. Es konnte jedoch keine Produktbildung detektiert werden.

Es wurde zudem untersucht, ob FtmO an der Reaktion von 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C zu Fumitremorgin B bzw. im folgenden Schritt, d.h. von Fumitremorgin B zu Verruculogen, beteiligt ist. Es war bekannt, dass die Reaktion von 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C zu Fumitremorgin B durch die Prenyltransferase FtmPT2 katalysiert wird (Grundmann *et al.*, 2008). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass FtmOx1 unter Zugabe von Fe²⁺ und α -Keto-

glutarat die Umsetzung von Fumitremogin B zu Verruculogen katalysiert (Steffan *et al.*, 2009). Es wurde jedoch nur ein Gesamtumsatz von ca. 10 % erreicht. Daher sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit von FtmO möglicherweise zu einem höheren Umsatz führt.

Für die Reaktionsansätze dienten 2 mM 12,13-Dihydroxyfumitremogin C als Substrat. Es wurde sowohl eine Tandem-Inkubation als auch eine Ko-Inkubation der Enzyme FtmPT2, FtmOx1 und FtmO getestet. Für die Tandem-Inkubation wurde zunächst für 90 min mit 5 µg FtmPT2, 2 mM DMAPP und 5 mM CaCl₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µg FtmOx1 (pAG025), 5 µg FtmO (pMM005 und pMM007), 1 mM α -Ketoglutarat, 1 mM FeCl₂ und 1 mM Ascorbinsäure. Zum direkten Vergleich wurden immer identische Reaktionsansätze mit bzw. ohne FtmO inkubiert. Bei den Ko-Inkubationen wurden alle beschriebenen Proteine und Substanzen direkt zusammengegeben und inkubiert. Alle Ansätze wurden mittels HPLC analysiert. Die Ergebnisse von Dr. Steffan konnten reproduziert werden, d.h. es entstand ca. 10 % Verruculogen. Die Vergleiche der jeweiligen Ansätze mit und ohne FtmO zeigten identische HPLC-Chromatogramme, so dass in keinem Fall eine Erhöhung des Umsatzes durch FtmO detektiert werden konnte. Auch über die Aktivität bzw. Inaktivität von FtmO kann dadurch keine Aussage getroffen werden.

Da ein Proteinsequenzvergleich von FtmO mit der NCBI-Datenbank Homologien zu *Ankyrin repeat* Proteinen ergab, wurde eine detaillierte Analyse der Proteinsequenz von FtmO durchgeführt. Bei der Analyse wurde speziell nach dem Sequenzmotiv der *Ankyrin repeats*, das nach Rubtsov & Lopina aus „GXTPLHXAAXXGHXXXV/AXXLLXXGAXXN/DXXXX“ besteht, in der Primärsequenz von FtmO gesucht (Rubtsov & Lopina 2000). Die Abb. 6-18 (Anhang) zeigt die Primärsequenz von FtmO mit den 17 identifizierten *Ankyrin repeats*. Die Analyse zeigte, dass N-terminal 84 und C-terminal 43 Aminosäuren keine *Ankyrin repeats* enthielten. Es wurde eine Sekundärstruktur-Vorhersage mit Hilfe des Programms APSSP (<http://imtech.res.in/raghava/apssp/>) für das Protein FtmO durchgeführt, welche in Abb. 6-19 (Anhang) dargestellt ist. Aus der Sekundärstruktur-Vorhersage ist ersichtlich, dass der erste *Ankyrin repeat* bei Tyr86 und der letzte mit Gln661 endet. Bei Val471 wurde die Abfolge der *Ankyrin repeats*, bestehend aus zwei aufeinanderfolgenden α -Helixes denen jeweils ein β -hairpin loop folgt, unterbrochen. Für den restlichen N- und C-Terminus wurde keine Sekundärstruktur-Vorhersage erhalten. FtmO könnte demnach wie andere *Ankyrin repeat* Proteine für die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sein.

3.4 Versuche zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von FgaOx1

Vor den Versuchen zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von FgaOx1 bzw. EasE wurden Homologievergleiche von FgaOx1 aus *A. fumigatus* bzw. EasE aus *C. purpurea* mit der NCBI-Datenbank mit Hilfe des Programms „BLAST 2 SEQUENCES“ durchgeführt. Es ergaben sich dabei Homologien zu FAD-bindenden Oxidoreduktasen und auch zu

FAD/FMN-enthaltenden Isoamylalkoholoxidasen. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden den Reaktionsansätzen die Kofaktoren FAD und FMN zugegeben.

Obwohl in keiner SDS-PAGE eine Überexpression von *fgaOx1* (pMM012, pMM013, pMM016 und pMM019) bzw. *easE* (pMM021) detektiert wurde (Kap. 3.2.5 und Kap. 3.2.6), erfolgten mit allen umgepufferten Elutionsfraktionen Inkubationen zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität. Es bestand die Möglichkeit, dass die Mengen an heterologem Protein in den Elutionsfraktionen unterhalb der Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung lagen. Mittels HPLC könnte jedoch vorhandene, enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

Es wurden zum Einen Tandem-Inkubationen durchgeführt und zum Anderen erfolgten Inkubationen mit DMA-L-Abrin, welches zuvor mittels HPLC isoliert wurde. Für die Tandem-Inkubationen wurde 1 mM L-Abrin durch Zugabe von 5 µg FgaPT2, 2 mM DMAPP und 5 mM CaCl₂ zu DMA-L-Abrin umgesetzt. Das DMA-L-Abrin wurde mit den umgepufferten Elutionsfraktionen inkubiert und zusätzlich 4 µg bzw. 1 µg Katalase sowie die Kofaktoren FAD, FMN, NAD⁺, NADP⁺, NADH und NADPH zugegeben. Es wurde sowohl jeder Kofaktor einzeln, als auch Kombinationen der Kofaktoren getestet. Da zu dem damaligen Zeitpunkt auch eine mögliche Beteiligung von FgaOx3 (pCW04) und FgaFS (pMM003) an der Reaktion nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden auch diese Proteine in verschiedenen Reaktionsansätzen ko-inkubiert. Alle Ansätze wurden mittels HPLC analysiert. Es konnte jedoch in keinem Fall eine Aktivität von FgaOx1 bzw. EasE detektiert werden.

3.5 Versuche zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von FgaFS

Auch im Falle von FgaFS wurden Sequenzvergleiche mit der NCBI-Datenbank durchgeführt. Als Ergebnis wurden Homologien von FgaFS mit Nukleosiddiphosphat-Zuckerepimerasen erhalten. Diese zählen zu den Isomerasen. Daher wurde postuliert, dass FgaFS möglicherweise bei der Isomerisierung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Agroclavin beteiligt ist (Kap. 1.5 Abb. 1-10).

Während der Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von FgaFS (pMM003) konnte Christiane Wallwey mit dem in dieser Arbeit aus cDNA von *A. fumigatus* B5233 amplifiziertem Gen *fgaDH* (Kap. 3.2.3) zeigen, dass FgaDH die Umsetzung von Chanoclavin-I zu Chanoclavin-I-Aldehyd katalysiert (Abb. 3-32) (Wallwey *et al.*, 2010a). Hierzu benötigt das Enzym den Kofaktor NAD⁺. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurden daher zur Auffindung der enzymatischen Funktion von FgaFS die Substrate DMA-L-Abrin und Chanoclavin-I-Aldehyd getestet. Das Chanoclavin-I-Aldehyd wurde dabei aus Chanoclavin-I enzymatisch mit FgaDH (pCW03) in Gegenwart von NAD⁺ hergestellt und sowohl für Tandem- als auch für Ko-Inkubationen verwendet. Bei den Tandem- bzw. Ko-Inkubationsansätzen wurden das aufgereinigte FgaFS und verschiedene Kombinationen an Kofaktoren zugegeben. Dabei wurden jeweils 5 mM der Salze CaCl₂, CoCl₂, MgCl₂ und MnCl₂ sowie die Kofaktoren

FAD, FMN, NADP⁺, NADH und NADPH und deren Kombinationen getestet. Bei all diesen Ansätzen konnte jedoch keine Produktbildung mittels HPLC beobachtet werden.

Erst die Ko-Inkubation von FgaOx3 (pCW04) und FgaFS (pMM003) in Gegenwart von FMN und NADH, die von Christiane Wallwey durchgeführt wurde (Wallwey *et al.*, 2010b), zeigte den Umsatz von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin (Abb. 3-32).

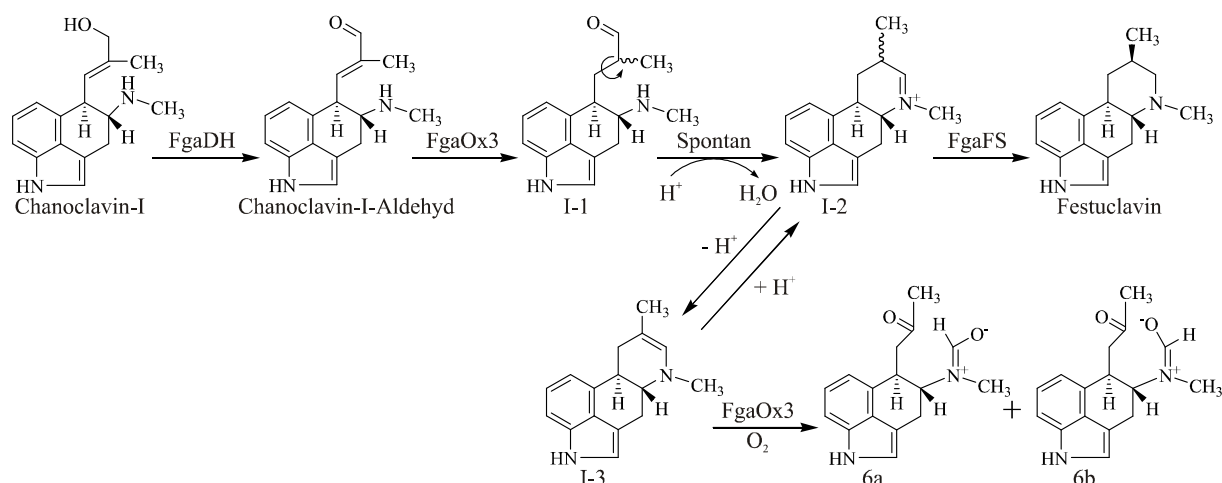


Abb. 3-32: Biosyntheseweg von Chanoclavin-I über Chanoclavin-I-Aldehyd nach Festuclavin in *A. fumigatus*. Modifiziert nach (Wallwey *et al.*, 2010b). **6a** und **6b**: Zwei Isomer-Strukturen des Nebenprodukts. I-1 bis I-3 sind Intermediate.

Es zeigte sich weiterhin, dass die Reaktion nur in Anwesenheit beider Enzyme stattfand. Wenn Chanoclavin-I-Aldehyd nur in Gegenwart von FgaOx3, NADH und FMN inkubiert wurde, konnte die Entstehung zweier Isomere von *N*-Methyl-*N*-[(5*R*,10*R*)-10-(2-oxo-propyl)-2,4,5,10-tetrahydrobenzo[*cd*]-indol-5-yl]formamid beobachtet werden (Wallwey *et al.*, 2010b; Xie *et al.*, 2011) (Abb. 3-32 **6a** und **6b**). Die Isomere wurden von FgaFS nicht als Substrat akzeptiert (Abb. 3-32) und bisher in der Literatur auch nicht aus Kulturextrakten isoliert. Daher scheint es sich bei den zwei Isomeren um *in vitro* Nebenprodukte zu handeln (Wallwey *et al.*, 2010b; Xie *et al.*, 2011).

3.6 EasG katalysiert in Gegenwart von reduziertem Glutathion (GSH) die Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Agroclavin

3.6.1 Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von EasG und EasA

Nachdem die beiden Enzyme EasA (pMM046) und EasG (pMM044) aufgereinigt vorlagen (Kap. 3.2.7), wurden unter Berücksichtigung der zuvor beschriebenen Ergebnisse mit FgaDH, FgaOx3 und FgaFS Enzyminkubationen mit EasA und EasG durchgeführt (Kap. 3.5). Dabei wurde in Analogie zu den Ergebnissen von FgaOx3 und FgaFS postuliert, dass EasA und EasG in Gegenwart der Kofaktoren FMN und NADH die Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Agroclavin katalysieren. Zunächst wurde Chanoclavin-I als Substrat eingesetzt

und dieses mit FgaDH (pCW03) und NAD^+ zu Chanoclavin-I-Aldehyd umgesetzt. Die Proteine EasA und EasG wurden mit den Kofaktoren NADH und FMN ko-inkubiert. Zudem wurden weitere Kofaktoren, beispielsweise NADPH und FAD, getestet. Die Auswertung der Reaktionsansätze erfolgte mittels HPLC, wobei jedoch kein Peak mit der Retentionszeit von Agroclavin beobachtet wurde. Daher wurden erneute Inkubationen mit zuvor isoliertem Chanoclavin-I-Aldehyd (Kap. 2.4.7.2 und 2.5.1) durchgeführt. Es konnte ebenfalls keine Produktbildung beobachtet werden (Abb. 3-33 B und C).

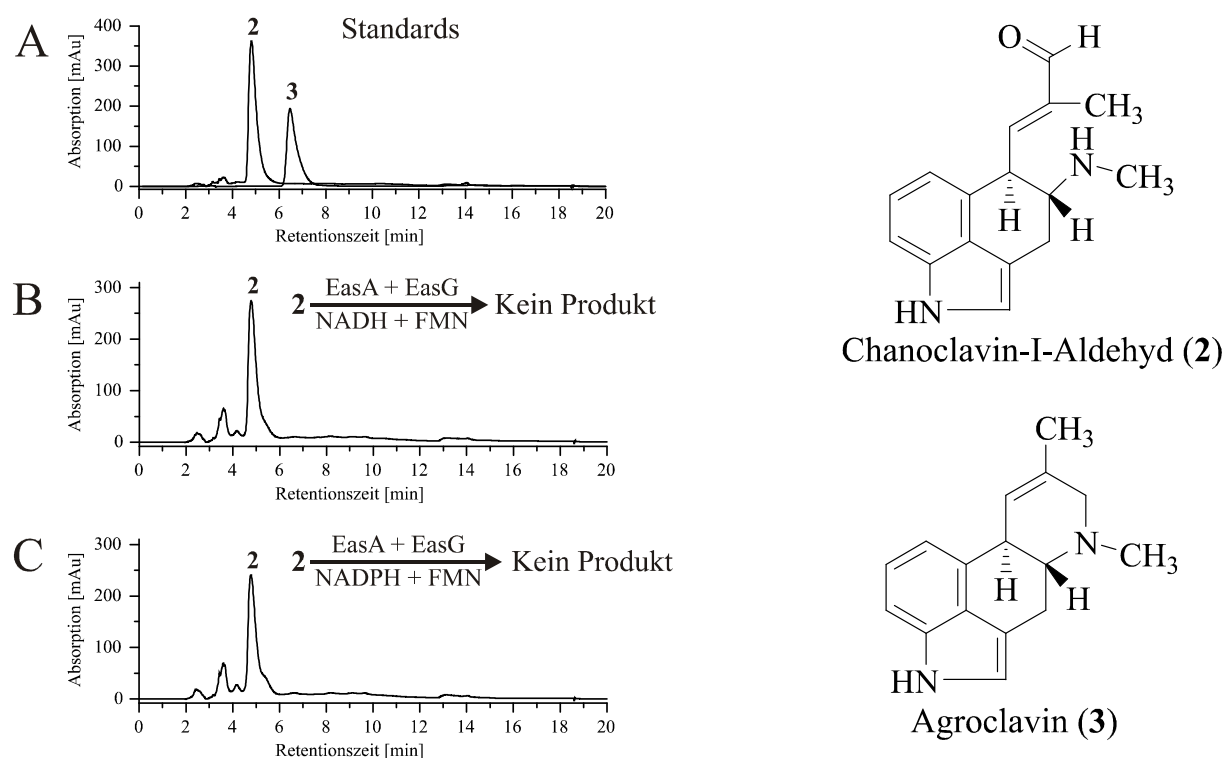


Abb. 3-33: HPLC-Chromatogramme von Reaktionsansätzen mit Chanoclavin-I-Aldehyd nach Inkubation mit den Enzymen EasA und EasG. Die Reaktionsansätze (100 μl) enthielten 5 mM der Kofaktoren FMN, NADH, NADPH, 1 mM Chanoclavin-I-Aldehyd und 5 μg der rekombinanten Enzyme und wurden bei 30 °C für 15 h inkubiert. Die Substanzen wurden bei 282 nm detektiert. **2:** Chanoclavin-I-Aldehyd; **3:** Agroclavin

Aus Inkubationen, in denen die orthologen Proteine von *A. fumigatus* mit denen von *C. purpurea* kombiniert wurden (EasA mit FgaFS bzw. FgaOx3 mit EasG) (Kap. 3.7), zeigte sich, dass EasA aus *C. purpurea* (pMM046) inaktiv war, EasG aus *C. purpurea* (pMM044) jedoch Aktivität aufwies. Daher wurde nach einer Ursache für die Inaktivität von EasA gesucht. Es wurden andere *E. coli*-Expressionsstämme, verschiedene pH-Werte der Pufferlösungen, die Zugabe von PMSF bzw. FMN in den Lysepuffer und der Zusatz von 2-Mercaptoethanol getestet. Eine ausführliche Beschreibung der getesteten Bedingungen wurde bereits im Kap. 3.2.7 beschrieben. Bei Verwendung des Reduktionsmittels 2-Mercaptoethanol in den Puffern zur Aufreinigung von EasA wurden bei den Reaktionsansätzen von EasA mit EasG und den Kofaktoren NADPH und FMN Aktivität nachgewiesen. Weitere Reaktionsansätze mit dem EasA, welches zuvor durch Hitze denaturiert wurde, zeig-

ten jedoch keine Reduzierung der Aktivität. Daher wurde das EasA in einer weiteren Analyse durch Zugabe eines Puffers, welcher 2-Mercaptoethanol enthielt, ersetzt (Abb. 3-34 B). Das Chanoclavin-I-Aldehyd wurde dabei nach der Inkubation vollständig zu der neuen Substanz (**3**) umgesetzt, deren Retentionszeit der des Agroclavin-Standards ähnelt. In Abb. 3-34 C wurde das 2-Mercaptoethanol durch GSH ersetzt, das ein in lebenden Zellen vorzufindendes Reduktionsmittel darstellt. In diesem Reaktionsansatz wurde eine relative Produktentstehung von 54 % erreicht.

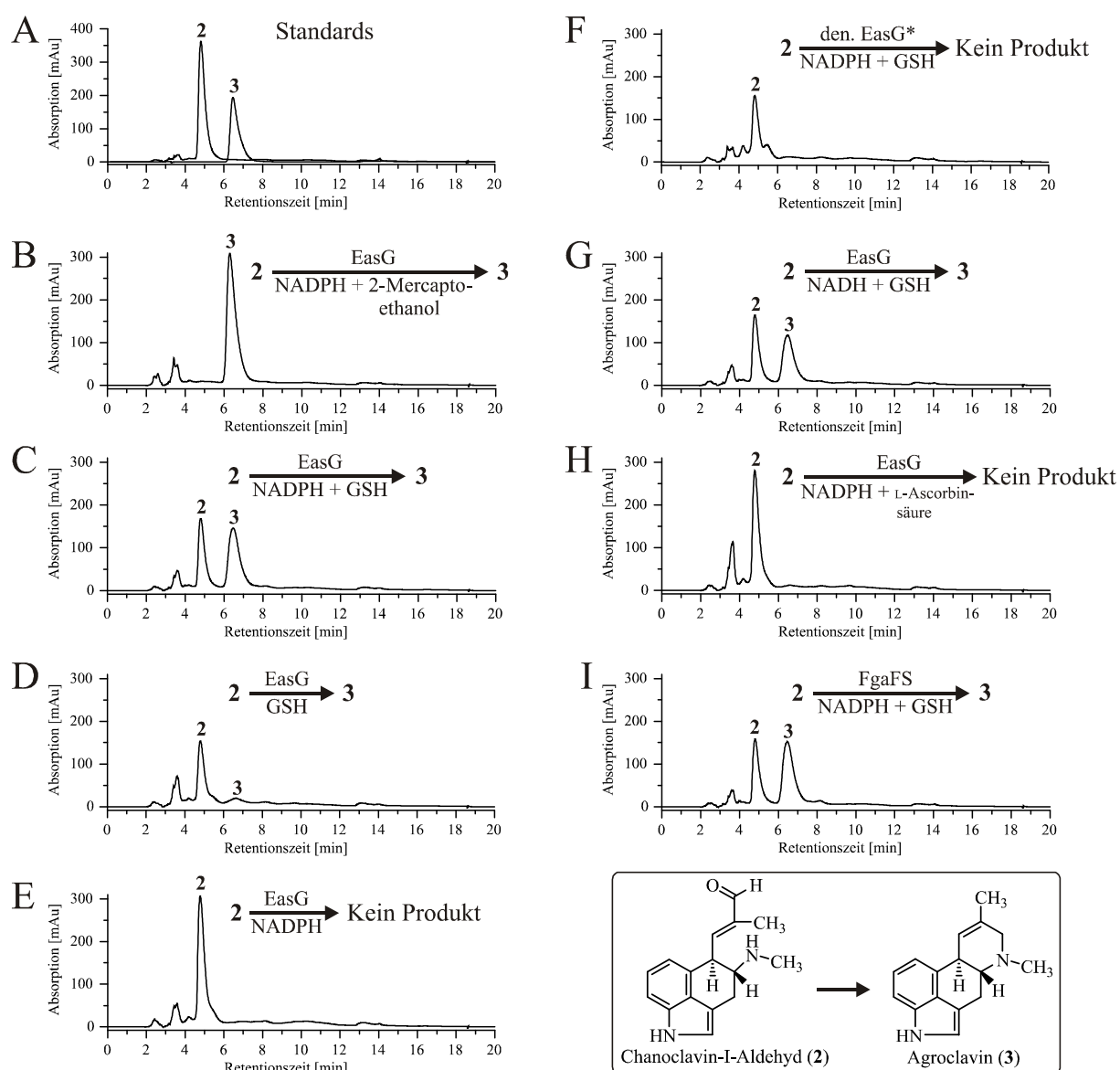


Abb. 3-34: HPLC-Chromatogramme von Reaktionsansätzen mit Chanoclavin-I-Aldehyd nach Inkubation mit den Enzymen EasA und EasG. Die Reaktionsansätze (100 µl) enthielten 5 mM der Kofaktoren FMN, NADH, NADPH, 1 mM GSH, 1 mM Chanoclavin-I-Aldehyd und 5 µg der rekombinanten Enzyme und wurden bei 30 °C für 15 h inkubiert. Die Substanzen wurden bei 282 nm detektiert. * Durch Hitze inaktiviertes EasG. 2: Chanoclavin-I-Aldehyd; 3: Agroclavin

Ohne den Kofaktor NADPH wurde eine relative Produktentstehung von ca. 4 % detektiert (Abb. 3-34 D). Diese geringe Produktbildung könnte durch NADPH, das von EasG während der Aufreinigung aus *E. coli* gebunden wurde, hervorgerufen worden sein. Dennoch erklärt der geringe Produktpeak nicht die detektierte Abnahme des Substrat-Peaks. Diese Diskrepanz, die auch in dem Chromatogramm in Abb. 3-34 F zu sehen ist, deutet auf eine chemische Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd mit GSH hin (Kap. 3.6.4). Ohne GSH im Reaktionsansatz (Abb. 3-34 E) wurde keine Aktivität beobachtet. Ebenso wurde keine Produktentstehung beobachtet, wenn EasG zuvor durch Hitze denaturiert wurde (Abb. 3-34 F). Das Ersetzen von NADPH durch NADH in Abb. 3-34 G verminderte den relativen Gesamtumsatz auf 43 %. Die Abb. 3-34 H mit L-Ascorbinsäure statt GSH zeigt, dass nicht jedes Reduktionsmittel für die Reaktion verwendet werden kann. Die Abb. 3-34 zeigt, dass statt des EasG auch das orthologe Protein FgaFS aus *A. fumigatus* die Reaktion katalysieren kann.

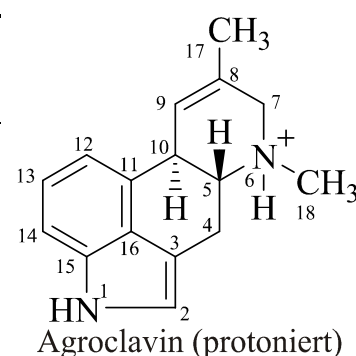
3.6.2 Strukturaufklärung von Agroclavin

Zur Strukturaufklärung mittels NMR- und MS-Analysen wurden 1,5 mg des enzymatischen Produkts (**3**) aus Abb. 3-34 C nach Inkubation von Chanoclavin-I mit NADPH, GSH, FgaDH und EasG (Kap. 2.4.7.3) präparativ mittels HPLC isoliert. Die Authentizität des Agroclavin-Standards wurde durch die Aufnahme eines ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrums des Standards als freie Base in CDCl_3 bestätigt. Die Zuordnung der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Signale wurde durch die DQF-COSY-, HSQC-, HMBC- und ROESY-Spektren unterstützt (Anhang Abb. 6-23 bis Abb. 6-30). Die Tab. 6-1 (Anhang) fasst die ermittelten NMR-Daten des Agroclavin-Standards in deprotonierter Form zusammen. Zusätzlich wurde ein Vergleich mit den Literaturdaten von Flieger *et al.* (1991) und Ninomiya *et al.* (1991) aufgelistet.

Da ein authentischer Agroclavin-Standard vorhanden war, konnte das ^1H -NMR-Spektrum der isolierten Substanz mit diesem verglichen werden. Weil die isolierte Substanz in protonierter Form vorlag, wurde der authentische Agroclavin-Standard für den direkten Vergleich mit Acetonitril und 0,5 % Trifluoressigsäure behandelt und ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen. Beide Spektren wurden in CD_3OD aufgenommen. Die Abb. 6-22 (Anhang) zeigt, dass beide ^1H -NMR-Spektren sich sehr ähneln. Die Tab. 3-6 fasst die ^1H -NMR-Signale der beiden Spektren zusammen. Somit wurde das enzymatische Produkt als Agroclavin identifiziert. Dieses Ergebnis wurde zudem durch eine ESI-MS-Analyse, in der ein $[\text{M}+1]^+$ -Ion bei $m/z = 238,8$ detektiert wurde (Anhang Abb. 6-33), bestätigt. Der theoretische m/z Wert wurde als 239,2 berechnet.

Tab. 3-6: ^1H -NMR-Daten des isolierten Agroclavins mit dem Agroclavin-Standard, jeweils in protonierter Form in CD_3OD aufgenommen.

Agroclavin-isoliert		Agroclavin-Standard	
Position	δ_{H} , multi., J in Hz	Position	δ_{H} , multi., J in Hz
2	7,09, s	2	7,07, s
3	-	3	-
4 $_{\alpha}$	3,72, dd, 14, 3,5	4 $_{\alpha}$	3,68, dd, 14, 4
4 $_{\beta}$	3,06, d, 12,5	4 $_{\beta}$	3,05, d, 14,5
5 $_{\beta}$	3,51, m	5 $_{\beta}$	3,46, m
7 $_{\alpha}$	3,98, d, 16,5	7 $_{\alpha}$	3,97, d, 16
7 $_{\beta}$	3,87, d, 15,5	7 $_{\beta}$	3,82, d, 16,5
8	-	8	-
9	6,49, s	9	6,47, s
10 $_{\alpha}$	4,11, d, 10	10 $_{\alpha}$	4,11, d, 9,5
11	-	11	-
12	7,05, d, 7	12	7,04, d, 7,5
13	7,16, t, 15,5, 7,8	13	7,16, t, 15,5, 7,8
14	7,25, d, 8	14	7,25, d, 8
15	-	15	-
16	-	16	-
17	1,93, s	17	1,92, s
18	3,15, s	18	3,13, s



3.6.3 Bestimmung des Molekulargewichts von EasG-His₆

Die Bestimmung des Molekulargewichts von EasG-His₆ erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie über die HiLoad 16/60 Superdex 200-Säule. Diese wurde zuvor mit verschiedenen Standardproteinen kalibriert (Kap. 2.4.3). Das Elutionsvolumen von EasG-His₆ betrug 88 ml. Das entspricht einem Molekulargewicht von 33 kDa. Das theoretische Molekulargewicht von EasG-His₆ wurde mit 32 kDa berechnet. Das Protein lag somit als Monomer vor.

3.6.4 Nicht-enzymatische Reaktion von GSH mit Chanoclavin-I-Aldehyd

Wie in Kap. 3.6.1 beschrieben, zeigte sich bei der Inkubation von Chanoclavin-I-Aldehyd mit GSH und EasG eine Abnahme des Substrat-Peaks, welches nicht im Verhältnis mit der beobachteten Produktentstehung stand (Abb. 3-34 D). Es wurden daher Inkubationen zur Konzentrationsabhängigkeit und Zeitabhängigkeit der Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd mit GSH durchgeführt (Abb. 3-35). In Abb. 3-35 A ist eine Abnahme der Chanoclavin-I-Aldehyd Menge um 22, 60 bzw. 80 % unter Zugabe von 1, 3 bzw. 5 mM GSH nach 80 min Inkubation

bei 30 °C zu erkennen. Bei Verwendung von 5 mM GSH verringerte sich die Menge des Chanoclavin-I-Aldehyds bereits nach 15 min Inkubation bei 30 °C um 40 %.

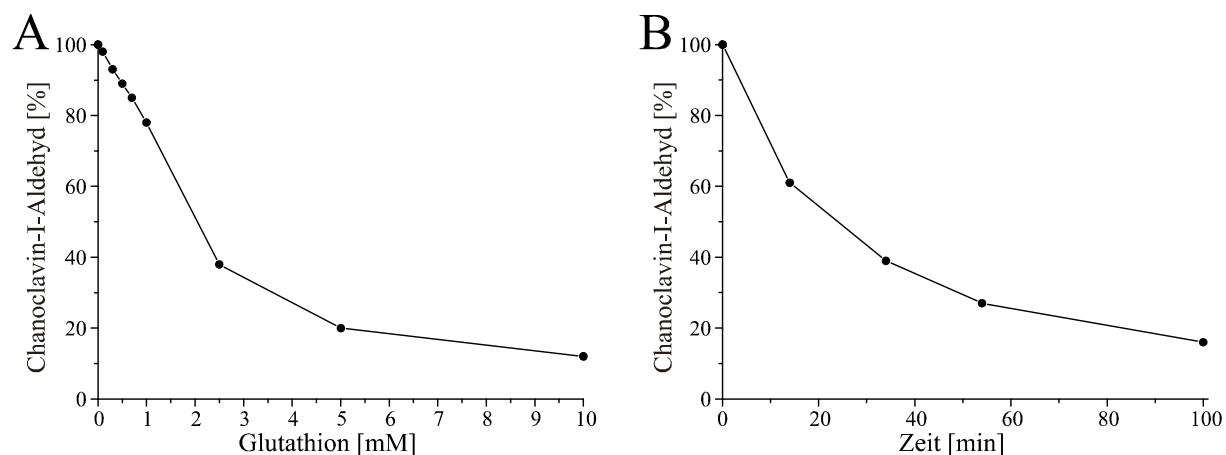


Abb. 3-35: A: Abhängigkeit der Abnahme von Chanoclavin-I-Aldehyd von der GSH Konzentration. Die Reaktionsansätze (100 μ l) enthielten 1 mM Chanoclavin-I-Aldehyd und verschiedene Konzentrationen an GSH. Die Reaktionsansätze wurden 80 min bei 30 °C inkubiert. **B: Abhängigkeit der Abnahme von Chanoclavin-I-Aldehyd von der Reaktionszeit mit GSH.** Die Reaktionsansätze (100 μ l) enthielten 1 mM Chanoclavin-I-Aldehyd und 5 mM GSH und wurden unterschiedlich lange inkubiert.

Auch nach detaillierter Analyse der HPLC-Chromatogramme konnte kein Produkt-Peak eines Chanoclavin-I-Aldehyd-GSH Intermediats identifiziert werden. Daher ist in Abb. 3-35 nur die Abnahme des Chanoclavin-I-Aldehyds dargestellt. In den jeweiligen Reaktionsansätzen zeigte sich jedoch ein schwarzes Präzipitat. Versuche dieses Präzipitat in einem Lösungsmittel, darunter Aceton, Methanol und DMSO, für eine NMR- oder MS-Analyse zu lösen schlugen fehl. Auch eine Protonierung bzw. Deprotonierung führte zu keiner Verbesserung der Löslichkeit. Daher wurden weitere Inkubationen von Chanoclavin-I-Aldehyd mit GSH und zusätzlich mit den Thiolen 2-Mercaptoethanol und DTT durchgeführt (Abb. 3-36). Unter der Bedingung A, in der nur Chanoclavin-I-Aldehyd und das jeweilige Thiol inkubiert wurden, konnte bei Verwendung von 2-Mercaptoethanol ein zusätzlicher Peak bei 6,7 min und unter Verwendung von DTT ein zusätzlicher Peak bei 8,1 min detektiert werden. Beide Peaks wurden auch unter Bedingung B, d.h. mit Zusatz von NADPH, und ebenfalls unter Bedingung C, bei der NADPH und EasG mit inkubiert wurden, beobachtet.

Da der zusätzliche Peak die größte Fläche bei der Verwendung von DTT aufwies, wurde für die Isolierung der Substanz ein 30 ml Reaktionsansatz mit Zusatz von DTT verwendet. Für die Isolierung über die semi-präparative Säule wurde entsprechend mehr Reaktionsprodukt injiziert, wodurch ein weiterer Peak bei 6,5 min detektiert wurde (Abb. 3-36, A Vergrößerung). Beide Peaks wurden isoliert und mittels ESI-MS analysiert.

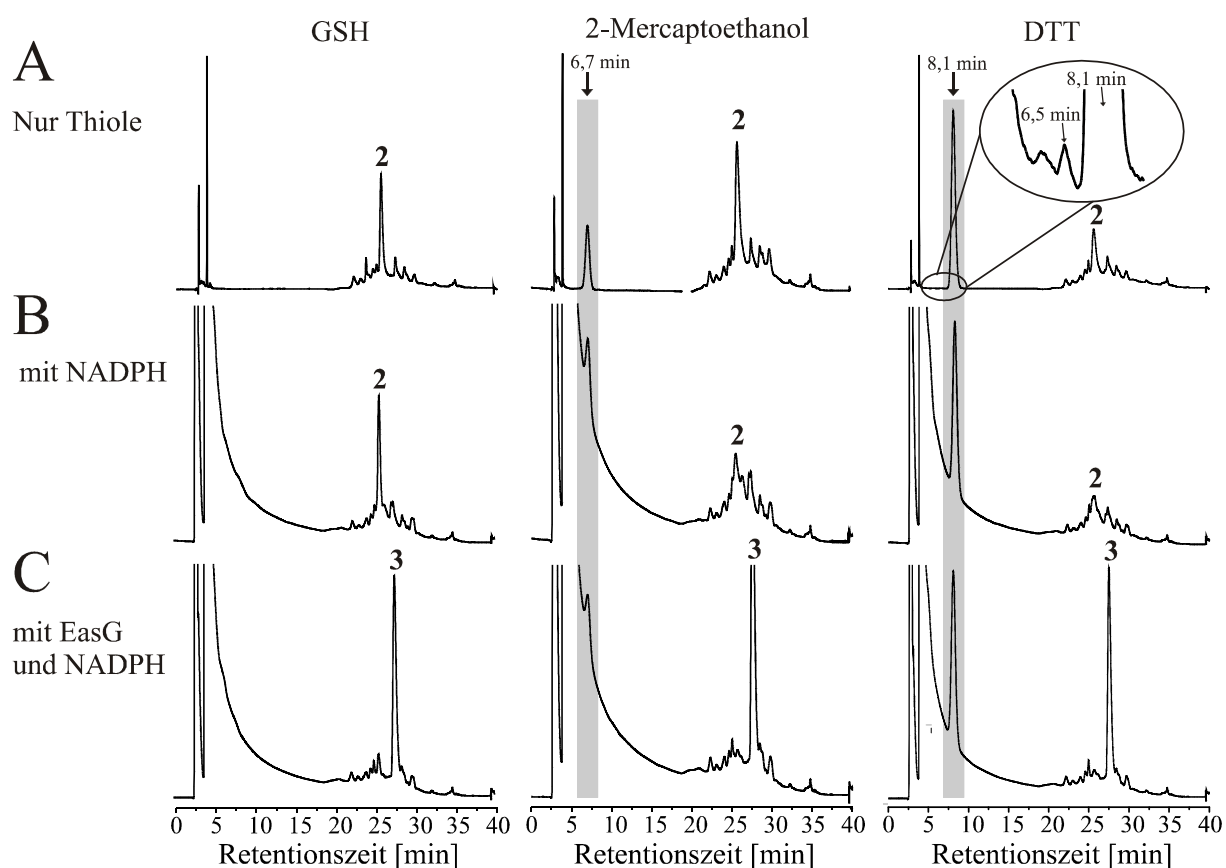


Abb. 3-36: Entstehung eines nicht-enzymatischen Produkts von Chanoclavin-I-Aldehyd mit unterschiedlichen Thiolen. Die Reaktionsansätze (100 μ l) enthielten 1 mM Chanoclavin-I-Aldehyd und 1 mM des jeweiligen Thiols unter den Bedingungen: A) ohne weiteren Zusatz, B) 1.5 mM NADPH und C) 1.5 mM NADPH und 2.5 μ g EasG. Die Reaktionsansätze wurden 16 h bei 30 °C inkubiert und über die semi-präparative Säule analysiert. **2:** Chanoclavin-I-Aldehyd; **3:** Agroclavin

Die ESI-MS-Analyse des Peaks mit der Retentionszeit 8,1 min ergab jedoch kein auswertbares Ergebnis. Es konnte zudem nach Inkubation dieser isolierten Substanz mit der Retentionszeit 8,1 min mit NADPH und EasG keine Produktentstehung von Agroclavin beobachtet werden (Abb. 3-37 B). Für den Peak mit der Retentionszeit von 6,5 min wurde ein $[M+1]^+$ -Ion mit $m/z = 409,1$ gemessen (Anhang Abb. 6-34), welches einem Chanoclavin-I-Aldehyd-DTT Intermediat mit einer theoretischen Masse von $m/z = 408,2$ g/mol entspricht (Kap. 4.4 Abb. 4-1). Eine Aufklärung der Struktur des Intermediats mittels NMR konnte auf Grund der geringen Menge an Substanz nicht durchgeführt werden. Zudem zeigte sich, dass sich die Substanz mit der Retentionszeit 6,5 min durch eine Lagerung bei Raumtemperatur zu der Substanz mit der Retentionszeit von 8,1 min umwandelte (Abb. 3-37 C). Die direkte Inkubation der isolierten Substanz mit NADPH und EasG resultierte zudem in einem Peak mit der Retentionszeit von Agroclavin (Abb. 3-37 D), wodurch das Vorhandensein des Chanoclavin-I-Aldehyd-DTT Intermediats bestätigt wurde.

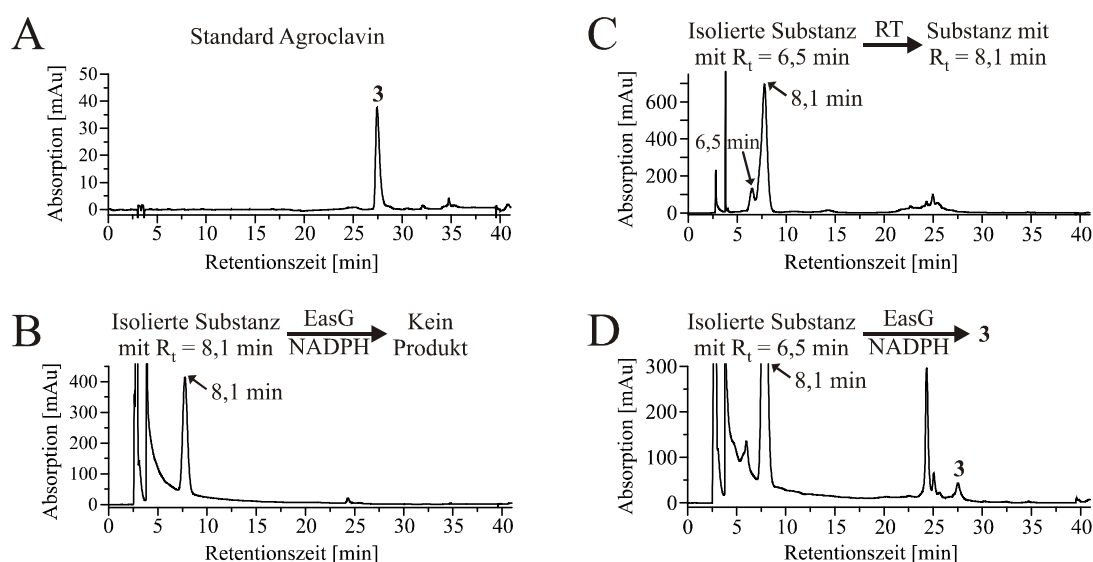


Abb. 3-37: HPLC-Chromatogramme der isolierten Chanoclavon-I-Aldehyd-DTT Intermediat nach der Inkubation ohne und mit EasG. Die Reaktionsansätze (100 μ l) enthielten die isolierten Chanoclavon-I-Aldehyd-DTT Intermediat, 1,5 mM NADPH und 2,5 μ g EasG. Die Reaktionsansätze wurden 5 h bei 30 °C inkubiert. **3:** Agroclavin (R_t = Retentionszeit)

3.6.5 Abhängigkeit der EasG-Reaktion von der Proteinkonzentration und der Zeit

Die Abb. 3-38 zeigt die Abhängigkeit der Produktentstehung der EasG-Reaktion von der Proteinmenge. In Gegenwart von 1 mM GSH zeigt die Produktentstehung eine lineare Abhängigkeit bis 0,1 μ g EasG. Die Abhängigkeit der Produktentstehung der EasG-Reaktion von der Inkubationszeit bei Verwendung von 1 mM GSH und 0,1 μ g EasG ist in Abb. 3-39 dargestellt. Es wurde eine lineare Abhängigkeit bis zu einer Inkubationszeit von 10 min ermittelt.

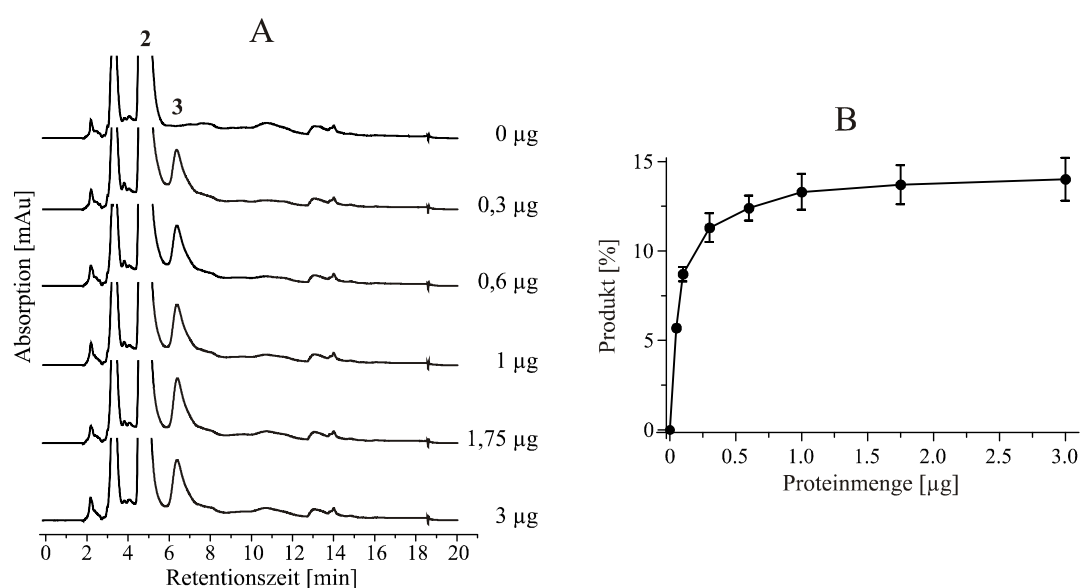


Abb. 3-38: Abhängigkeit der Produktentstehung der EasG-Reaktion von der Proteinmenge. Die Reaktionsansätze (100 μ l) enthielten 1,5 mM NADPH, 1 mM GSH, 1 mM Chanoclavon-I-Aldehyd und verschiedene Mengen an EasG. Die Ansätze wurden bei 30 °C für 15 h inkubiert. Die Substanzen wurden bei 282 nm detektiert. **2:** Chanoclavon-I-Aldehyd; **3:** Agroclavin

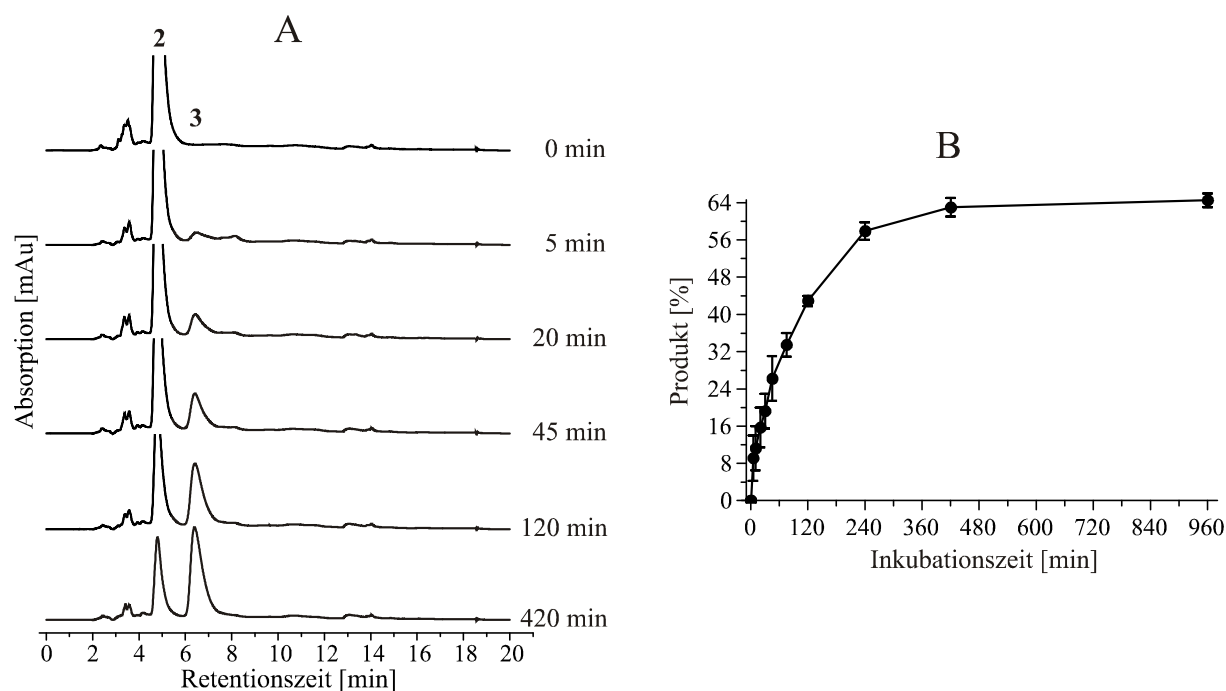


Abb. 3-39: Abhängigkeit der Produktentstehung der EasG-Reaktion von der Inkubationszeit. Die Reaktionsansätze (100 μ l) enthielten 1,5 mM NADPH, 1 mM GSH, 1 mM Chanoclavin-I-Aldehyd und 0,1 μ g (3 μ M) an EasG. Die Ansätze wurden bei 30 °C für verschiedene Zeiten inkubiert. Die Substanzen wurden bei 282 nm detektiert. **2:** Chanoclavin-I-Aldehyd; **3:** Agroclavin

3.6.6 Enzymatische Aktivität von EasG in Anwesenheit von FgaOx3

Da bekannt war, dass in *A. fumigatus* die Enzyme FgaOx3 und FgaFS zusammen die Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin katalysieren, sollte untersucht werden, warum die orthologen Proteine EasA und EasG aus *C. purpurea* nicht wie erwartet die Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Agroclavin katalysieren. Stattdessen wurde in Kap. 3.6.1 gezeigt, dass die Bildung von Agroclavin mit EasG in Gegenwart von GSH stattfindet.

Dazu wurden in Abb. 3-40 B als Vergleichschromatogramm zunächst die Ergebnisse der Inkubation von FgaOx3 und FgaFS reproduziert (Wallwey *et al.*, 2010b). In Abb. 3-40 C wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich 1 mM GSH zugegeben. Das Chromatogramm zeigt keine signifikanten Unterschiede. Bei Zugabe von 25 mM GSH wurde weiterhin Festuclavin als Hauptprodukt detektiert. Zusätzlich wurde aber auch ein Peak mit der Retentionszeit von Agroclavin beobachtet (Abb. 3-40 D). Die Abb. 3-40 E zeigt, dass keine Produktbildung bei der Inkubation von EasA in Kombination mit FgaFS beobachtet werden konnte. Dies bestätigt noch einmal, dass EasA keine Aktivität aufweist. Zudem zeigt die Abb. 3-40 F, dass bei vorhandenem FgaFS und GSH trotz der Gegenwart von EasA Agroclavin als Produkt gebildet wird.

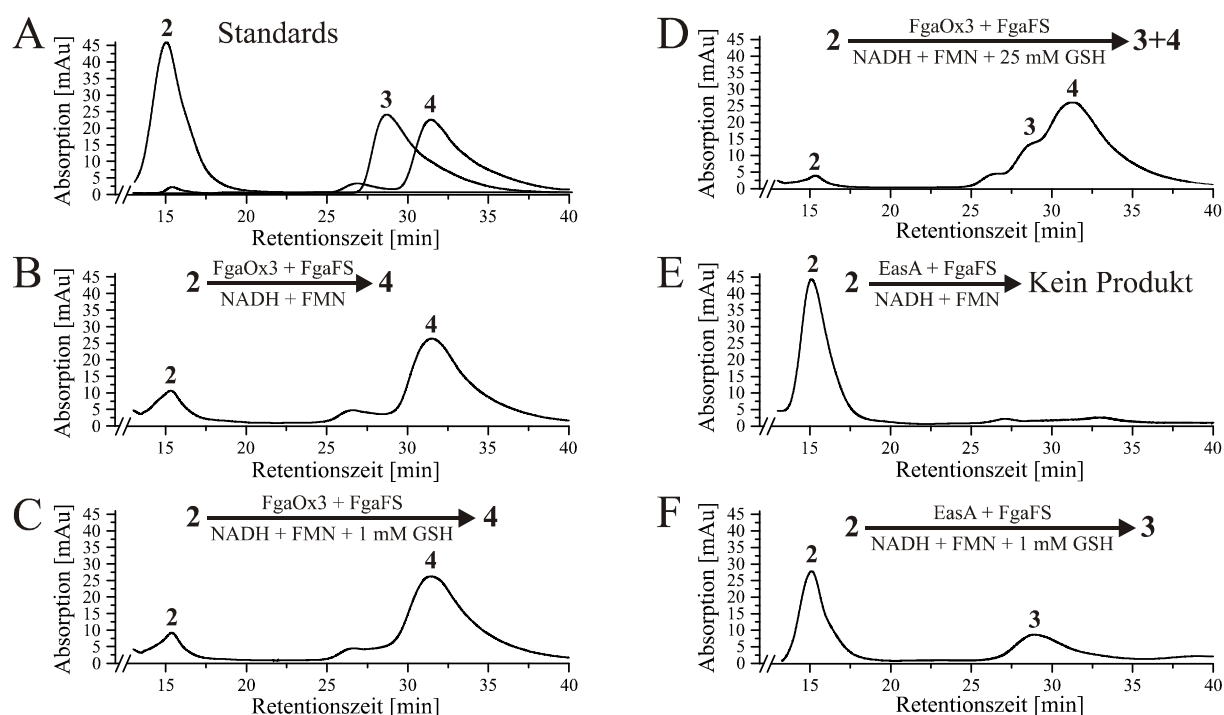


Abb. 3-40: HPLC-Chromatogramme von Reaktionsansätzen mit Chanoclavin-I-Aldehyd nach Inkubation mit verschiedenen Enzym- und Kofaktor-Kombinationen. Die Reaktionsansätze (100 μ l) enthielten 5 mM der Kofaktoren FMN und NADH, 1 mM bzw. 25 mM GSH, 1 mM Chanoclavin-I-Aldehyd und 5 μ g der rekombinanten Enzyme und wurden bei 30 °C für 2 h inkubiert. Die Substanzen wurden bei 282 nm detektiert. **2:** Chanoclavin-I-Aldehyd; **3:** Agroclavin; **4:** Festuclavin

3.7 Untersuchungen zur Kontrolle der Stereochemie bei der Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin und Pyroclavin

Wie schon im Kap. 3.6.1 kurz beschrieben, wurden Kombinationen von EasA und EasG mit den beiden aktiven Enzymen FgaOx3 und FgaFS von *A. fumigatus* durchgeführt, da die beiden Proteine EasA und EasG von *C. purpurea* bei der ersten Inkubationen mit Chanoclavin-I-Aldehyd keine Aktivität zeigten. Die Analysen mittels HPLC ergaben, dass EasA inaktiv war. Nach einer Methodenoptimierung zur Verbesserung der Trennleistung, wurden erneut Kombinationen der Enzyme durchgeführt. Der Vergleich des Reaktionsansatzes mit FgaFS (Abb. 3-41 C) gegenüber dem mit EasG (Abb. 3-41 D) zeigt einen signifikanten Unterschied. Der Peak von Festuclavin verringerte sich, wenn statt FgaFS das Enzym EasG vorlag, und die Intensität der Substanz (**5**) nahm zu. In der Arbeit von Wallwey *et al.* (2010b) wurde der Peak vor Festuclavin ursprünglich den beiden Isomeren (**6a** und **6b**) des Nebenprodukts zugeordnet (Kap. 3.6 Abb. 3-32).

Eine zusätzliche Analyse von zwei weiteren Reaktionsansätzen (Zusammensetzung wie in Abb. 3-41 C und D abgebildet) mittels Dünnschichtchromatographie ergab, dass zusätzlich zu Festuclavin und den Isomeren ein weiteres Produkt gebildet wurde. Das Verhältnis der Produkte variierte in den Reaktionsansätzen. Von dem neuen Produkt wurde qualitativ mehr in

dem Ansatz mit EasG gebildet (Abb. 3-42). Das neue Produkt wurde daher aus einem 20 ml Reaktionsansatz (Kap. 2.4.7.4) mit Chanoclavin-I als Substrat, FgaDH (pCW03), FgaOx3 (pCW04) und EasG (pMM044) als Enzyme über eine präparative DC isoliert (Kap. 2.5.1). Anschließend erfolgte zur Entfernung von Kieselgel-Verunreinigungen eine Aufreinigung mittels HPLC.

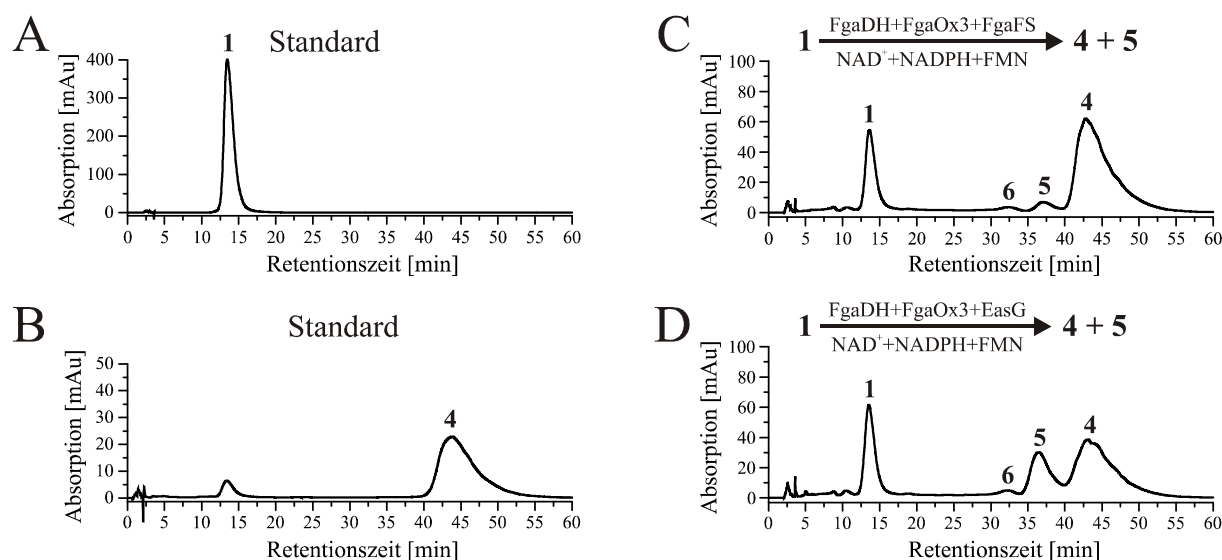


Abb. 3-41: HPLC-Chromatogramme von Reaktionsansätzen mit Chanoclavin-I nach Inkubation mit verschiedenen Enzym- und Kofaktor-Kombinationen. Die Reaktionsansätze (100 μ l) enthielten 5 mM der Kofaktoren NAD^+ , FMN, NADH, 1 mM Chanoclavin-I und 5 μ g der rekombinanten Enzyme und wurden bei 30 °C für 15 h inkubiert. Die Substanzen wurden bei 282 nm detektiert. 1: Chanoclavin-I; 4: Festuclavin; 5: Neues Produkt; 6: Nebenprodukt (6a) und (6b)

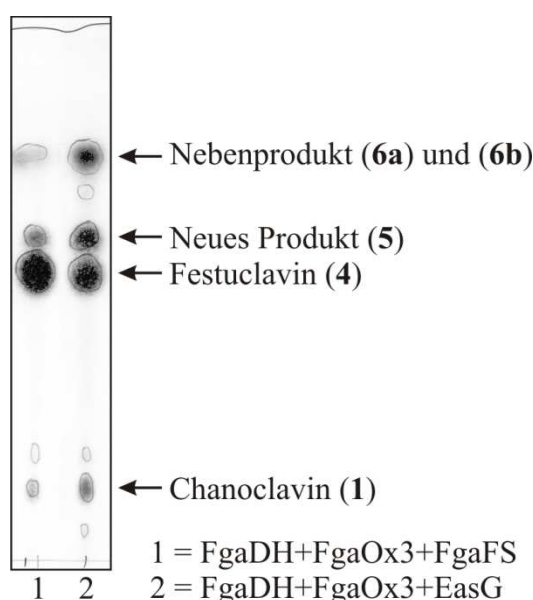


Abb. 3-42: Dünnschichtchromatographie von Reaktionsansätzen mit Chanoclavin-I nach Inkubation mit verschiedenen Enzym-Kombinationen. Die Reaktionsansätze (100 μ l) enthielten 5 mM der Kofaktoren NAD^+ , FMN, NADH, 1 mM Chanoclavin-I und 5 μ g der rekombinanten Enzyme und wurden bei 30 °C für 15 h inkubiert. Die Detektion der Ergotalkaloide erfolgte mittels der van Urk Reaktion.

3.7.1 Strukturaufklärung von Pyroclavin

Für die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie und MS wurden 1,7 mg des unbekannten Produkts (**5**) aus Abb. 3-42 aufgereinigt. Mit Hilfe der in CD₃OD aufgenommenen ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren (Anhang Abb. 6-35 und Abb. 6-37) sowie mit den DQF-COSY-, NOESY-, HSQC- und HMBC-Spektren (Anhang Abb. 6-39 bis Abb. 6-44) wurde die Substanz als Pyroclavin identifiziert, das Stereoisomer von Festuclavin (Matuschek *et al.*, 2012). Die Struktur von Pyroclavin ist in Abb. 3-43 dargestellt. Die Tab. 3-7 fasst die ermittelten ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Daten für das Pyroclavin in protonierter Form zusammen.

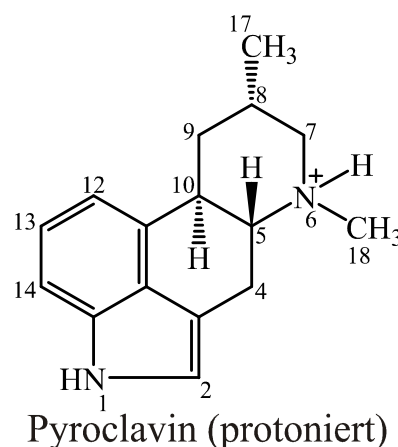


Abb. 3-43: Struktur von Pyroclavin.

Tab. 3-7: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Daten von Pyroclavin in protonierter Form in CD₃OD.

Position	δ _C	δ _H , multi., <i>J</i> in Hz	HMBC Kontakte
2	120,29	7,03, d, 1,5	C-2 zu H-4 _α , H-4 _β , H-12
3	108,10	-	C-3 zu H-2, H-4 _α , H-4 _β
4 _α	25,55	2,99, ddd, 14,0, 11,6, 1,7	C-4 zu H-5, H-18
4 _β		3,69, dd, 14,2, 4,5	-
5 _β	69,84	3,30**, td, 11,0, 4,5	C-5 zu H-4 _α , H-4 _β , H-7 _α , H-9 _β , H-12, H-18
7 _α	62,86	3,51, dt, 12,8, 1,5	C-7 zu H-17, H-18
7 _β		3,41*, dd, 12,8, 3,9	-
8 _β	28,12	2,49, m	C-8 zu H-7 _α , H-7 _β , H-9 _β , H-17, H-18
9 _α	32,72	2,63, ddt, 13,7, 3,6, 2,1	C-9 zu H-7 _α , H-17
9 _β		1,91, td, 13,1, 4,9	-
10 _α	35,56	3,41*, dt, 4,2, 11,6	C-10 zu H-4 _β , H-9 _β ,
11	130,42	-	C-11 zu H-9 _β , H-10 _α , H-13
12	113,95	6,90, dd, 7,2, 0,8	C-12 zu H-2, H-13, H-14
13	123,89	7,11, dd, 8,2, 7,2	C-13 zu H-12
14	110,65	7,20, d, 8,2	C-14 zu H-12
15	135,07	-	C-15 zu H-2, H-13
16	126,81	-	C-16 zu H-2, H-4 _β , H-12, H-14
17	17,29	1,37, d, 7,5	C-17 zu H-7 _β , H-9 _β
18	42,46	3,07, s	-

* = überlappende Signale, *J* ermittelt aus den Kreuz-Signalen des DQF-COSY, ** = Signal liegt unter dem Lösungsmittelsignal

Mittels ESI-MS-Analyse wurde ein $[M+1]^+$ -Ion bei $m/z = 241,2$ (Anhang Abb. 6-46) detektiert. Mittels hochauflösender EI-MS-Analyse wurde ein $[M]^+$ -Ion bei $m/z = 240,1609$ detektiert. Der theoretische Wert von m/z wurde auf 240,1626 berechnet. Die Tab. 3-8 liefert einen direkten Vergleich der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten zwischen Pyroclavin und Festuclavin. Betrachtet man die Protonen mit signifikanten Unterschieden (grau hervorgehoben) zwischen den beiden Stereoisomeren im ^1H -NMR, so stehen alle in räumlicher Nähe zum Chiralitätszentrum an C-8. Dabei treten deutliche Unterschiede in der chemischen Verschiebung für H-7 $_{\beta}$, H-8 $_{\beta}$, H-9 $_{\alpha}$, H-9 $_{\beta}$ und H-17 auf. Die chemischen Verschiebungen der Protonen im aromatischen Bereich zeigen keine signifikanten Unterschiede. Die HMBC-Kontakte zwischen H-18 und C-7 sowie H-7 $_{\alpha}$ und C-5 bestätigen das Vorhandensein des D-Rings.

Tab. 3-8: ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten Vergleich von Pyroclavin und Festuclavin in protonierter Form aufgenommen in CD_3OD . Die signifikanten Abweichungen in der chemischen Verschiebung zwischen den beiden Stereoisomeren im ^1H -NMR wurden grau hervorgehoben. Die ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten von Festuclavin in protonierter Form stammen aus der Arbeit (Wallwey *et al.*, 2010b).

Pyroclavin			Festuclavin		
Position	δ_{C}	δ_{H} , multi., J in Hz	Position	δ_{C}	δ_{H} , multi., J in Hz
2	120,29	7,03, d, 1,5	2	120,15	7,02, d, 1,4
3	108,10	-	3	108,22	-
4 $_{\alpha}$	25,55	2,99, ddd, 14,0, 11,6, 1,7	4 $_{\alpha}$	25,62	2,98, ddd, 13,9, 11,7, 1,6
4 $_{\beta}$		3,69, dd, 14,2, 4,5	4 $_{\beta}$		3,64, dd, 12,7, 5,0
5 $_{\beta}$	69,84	3,30, td, 11,0, 4,5	5 $_{\beta}$	68,35	3,20, dt, 4,1, 11,3
7 $_{\alpha}$	62,86	3,51, dt, 12,8, 1,5	7 $_{\alpha}$	63,13	3,55, ddd, 12,1, 3,8, 1,7
7 $_{\beta}$		3,41, dd, 12,8, 3,9	7 $_{\beta}$		2,86, t, 12,4
8 $_{\beta}$	28,12	2,49, m	8 $_{\alpha}$	30,01	2,25, m
9 $_{\alpha}$	32,72	2,63, ddt, 13,7, 3,6, 2,1	9 $_{\alpha}$	35,55	2,79, ddt, 13,3, 1,9, 3,6
9 $_{\beta}$		1,91, td, 13,1, 4,9	9 $_{\beta}$		1,33, dt, 12,2, 12,7
10 $_{\alpha}$	35,56	3,41, dt, 4,2, 11,6	10 $_{\alpha}$	40,13	3,29, dt, 3,2, 11,4
11	130,42	-	11	130,23	-
12	113,95	6,90, dd, 7,2, 0,8	12	113,77	6,90, d, 7,6
13	123,89	7,11, dd, 8,2, 7,2	13	123,63	7,11, t, 7,7
14	110,65	7,20, d, 8,2	14	110,45	7,21, d, 8,1
15	135,07	-	15	134,99	-
16	126,81	-	16	126,71	-
17	17,29	1,37, d, 7,5	17	18,56	1,13, d, 6,6
18	42,46	3,07, s	18	41,31	3,06, s

Die Stereochemie des Pyroclavins wurde über die NOE-Kontakte bestimmt (Abb. 3-44). Hierbei wurde die Konfiguration an C-5 (H-5 $_{\beta}$) und C-10 (H-10 $_{\alpha}$) als Bezugspunkt verwendet. Die NOE-Kontakte zwischen H-17 und H-10 $_{\alpha}$ bestätigten, dass CH₃-8 α -substituiert und H-8 β -substituiert war. Dies wurde sowohl durch die NOE-Kontakte zwischen H-17 und H-7 $_{\alpha}$ als

auch zwischen H-17 und H-9_α bestätigt. Zudem zeigten weder H-7_α, noch H-9_α NOE-Kontakte mit H-5_β, das aber wiederum wies NOE-Kontakte zu H-7_β und H-9_β auf.

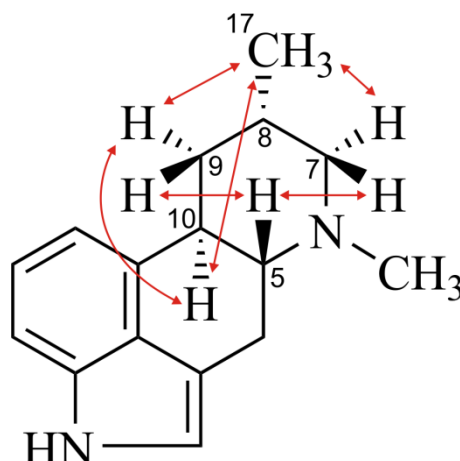


Abb. 3-44: NOE-Kontakte (rote Pfeile) zur Bestimmung der Stereochemie von Pyroclavin.

3.8 Nachweis der enzymatischen Aktivität von FgaFS_{pc} und FgaOx3_{pc}

Nachdem das neue Produkt als Pyroclavin identifiziert worden war und die Ergebnisse darauf hindeuteten, dass FgaFS und EasG die Stereochemie der Gesamtreaktion unterschiedlich festlegen, wurden die Proteine FgaOx3_{pc} und FgaFS_{pc} zusätzlich in die Untersuchungen mit einbezogen. Einerseits sollte die Frage geklärt werden, ob FgaOx3 bzw. FgaOx3_{pc} möglicherweise einen Einfluss auf die Stereochemie der Gesamtreaktion hat. Hierzu konnte EasA, bedingt durch seine Inaktivität, nicht genutzt werden. Andererseits war FgaFS_{pc} von besonderem Interesse, da aus *Penicillium crustosum* (Kawai *et al.*, 1992) und *P. commune* NRRL2033 (Unsöld & Li 2006) (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A isoliert wurde, das mit seiner (8*R*)-Konfiguration der Stereochemie von Pyroclavin entspricht. In *A. fumigatus* hingegen wurde (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin B (Ohmomo *et al.*, 1989) und (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin C (Ge *et al.*, 2009) isoliert, die mit ihrer (8*S*)-Konfiguration der Stereochemie von Festuclavin entsprechen.

Die Klonierung, Expression und Reinigung von fgaOx3_{pc} und fgaFS_{pc} wurde in Kap. 3.2.8 beschrieben. Nachdem FgaOx3_{pc} und FgaFS_{pc} aufgereinigt vorlagen, wurden die in Abb. 3-45 dargestellten Versuche zum Nachweis der enzymatischen Aktivität beider Proteine durchgeführt. Zum Vergleich wurde in Abb. 3-45 B ein Reaktionsansatz mit FgaOx3 und FgaFS aus *A. fumigatus* abgebildet. Die Abb. 3-45 C zeigt, dass mit FgaOx3_{pc} und FgaFS_{pc} zum Einen ein geringerer Gesamtumsatz als mit den beiden Proteinen aus *A. fumigatus* erhalten wurde, zum Anderen aber auch, dass ein anderes Verhältnis zwischen Pyroclavin und Festuclavin gebildet wurde. Außerdem entstand mehr von dem Nebenprodukt (6). Die Denaturierung von FgaOx3_{pc} führte dazu, dass das von FgaDH gebildete Chanoclavin-I-Aldehyd nicht weiter umgesetzt wurde (Abb. 3-45 D). Dagegen entstand durch die Denaturierung von FgaFS_{pc} nur das Nebenprodukt (Abb. 3-45 E). Schließlich zeigt die Abb. 3-45 F, dass FgaDH nur nötig ist

um Chanoclavin-I zu Chanoclavin-I-Aldehyd umzusetzen, es aber an der Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Pyroclavin und Festuclavin nicht direkt beteiligt ist.

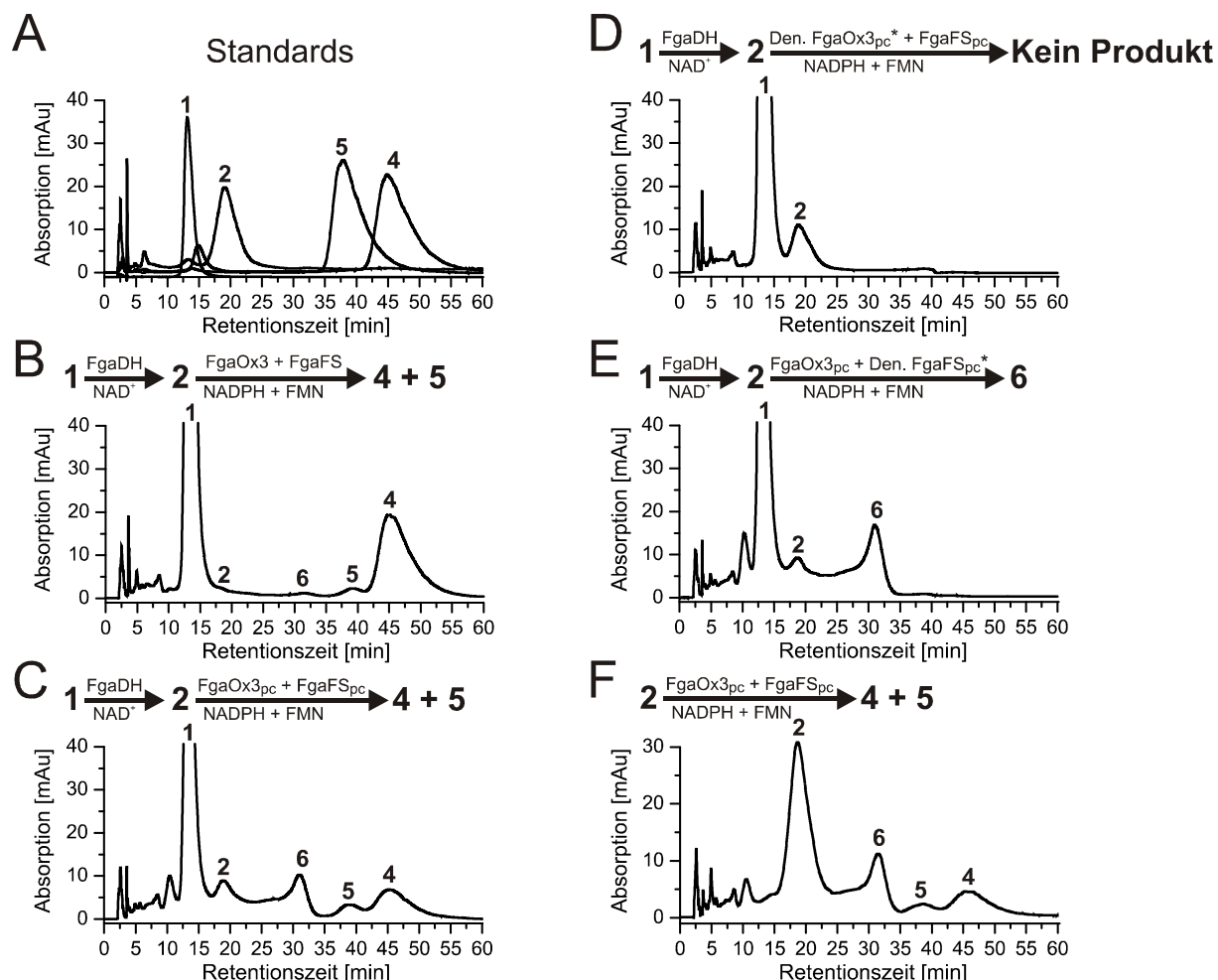


Abb. 3-45: HPLC-Chromatogramme von Reaktionsansätzen mit Chanoclavin-I und Chanoclavin-I-Aldehyd nach Inkubation mit verschiedenen Enzym- und Kofaktor-Kombinationen. Die Reaktionsansätze (100 μl) enthielten 5 mM der Kofaktoren NAD^+ , FMN, NADPH, 1 mM Chanoclavin-I, 1 mM Chanoclavin-I-Aldehyd und 5 μg der rekombinanten Enzyme und wurden bei 30 $^{\circ}\text{C}$ für 15 h inkubiert. Die Substanzen wurden bei 282 nm detektiert. * Durch Hitze inaktiviertes $\text{FgaOx3}_{\text{pc}}$ bzw. FgaFS_{pc} . 1: Chanoclavin-I; 2 Chanoclavin-I-Aldehyd; 4: Festuclavin; 5: Pyroclavin; 6: Nebenprodukt

3.8.1 Bestimmung des Molekulargewichts von $\text{FgaOx3}_{\text{pc}}$ und FgaFS_{pc}

Nachdem die Aktivität für beide Proteine nachgewiesen war, erfolgte die Bestimmung des Molekulargewichts mittels Größenausschlusschromatographie über die HiLoad 16/60 Superdex 200-Säule. Diese wurde zuvor mit verschiedenen Standardproteinen kalibriert (Kap. 2.4.3). Das Elutionsvolumen von $\text{FgaOx3}_{\text{pc}}\text{-His}_6$ wurde auf 60 ml bestimmt. Dies entspricht einem Molekulargewicht von 40 kDa. Das theoretische Molekulargewicht von $\text{FgaOx3}_{\text{pc}}\text{-His}_6$ wurde auf 43 kDa berechnet, daher lag das Protein als Monomer vor. Für das Protein $\text{FgaFS}_{\text{pc}}\text{-His}_6$ wurde ein Elutionsvolumen von 52 ml erhalten. Dies entspricht einem

Molekulargewicht von 64 kDa. Dadurch lag das FgaFS_{pc}-His₆ mit seinem theoretischen Molekulargewicht von 33 kDa als Dimer vor.

3.8.2 Stereoselektivität der Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin und Pyroclavin

Nachdem alle sechs orthologen Proteine aus *A. fumigatus*, *C. purpurea* und *P. commune* aufgereinigt vorlagen, wurden die in Abb. 3-46 abgebildeten Reaktionsansätze mit den verschiedenen Kombinationen der Proteine zur Untersuchung der Stereoselektivität durchgeführt.

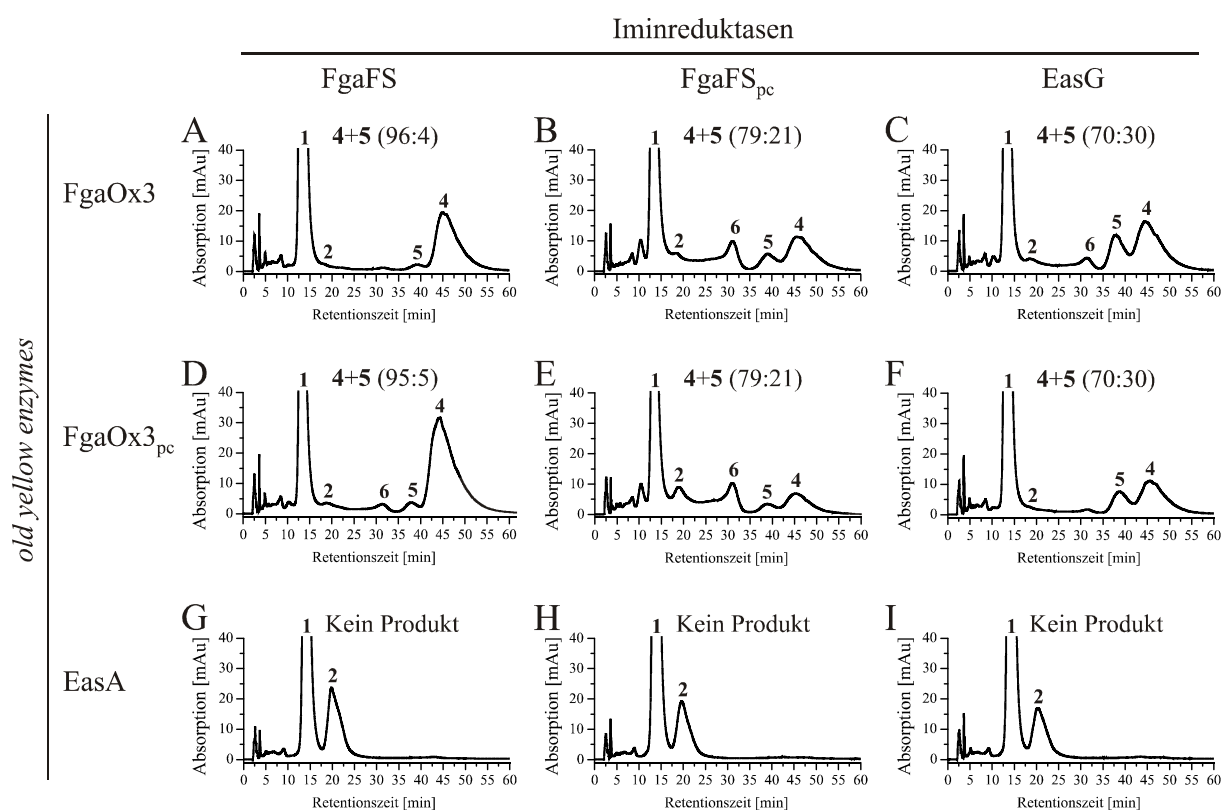


Abb. 3-46: HPLC-Chromatogramme von den Reaktionsansätzen mit Chanoclavin-I nach Inkubation mit verschiedenen Enzym- und Kofaktor-Kombinationen. Die Reaktionsansätze (100 µl) enthielten 5 mM der Kofaktoren NAD⁺, FMN, NADPH, 1 mM Chanoclavin-I und 5 µg der rekombinanten Enzyme und wurden bei 30 °C für 15 h inkubiert. Die Substanzen wurden bei 282 nm detektiert. 1: Chanoclavin-I; 2: Chanoclavin-I-Aldehyd; 4: Festuclavin; 5: Pyroclavin; 6: Nebenprodukt

Es wurde eine deutliche Abhängigkeit des Produktverhältnisses von der verwendeten Iminreduktase (FgaFS, FgaFS_{pc} und EasG) beobachtet. Mit FgaFS wurde fast ausschließlich Festuclavin (96 %) erhalten (Abb. 3-46 A). Durch die Verwendung von FgaFS_{pc} wurden 79 % (Abb. 3-46 B) und mit EasG nur noch 70 % Festuclavin detektiert (Abb. 3-46 C). Keine Auswirkung hatte der Austausch von FgaOx3 gegen FgaOx3_{pc} (Abb. 3-46 D bis F), da fast identische Produktverhältnisse erhalten wurden. Das Protein EasA zeigte, wie schon zuvor beschrieben (Kap. 3.6.1), keine Aktivität. Um eine mögliche Auswirkung der Proteinmenge und

des verwendeten Kofaktors auf die Produktverhältnisse zu untersuchen, wurden weitere Reaktionsansätze unter Verwendung von 10 µg der rekombinanten Proteine und 5 mM NADH statt NADPH durchgeführt. Die Tab. 3-9 und Tab. 3-10 fassen die Ergebnisse zusammen. Bei Zugabe von jeweils 10 µg der Proteine erhöhte sich der Gesamtumsatz, es ergaben sich aber keine signifikanten Unterschiede in dem Produktverhältnis von Festuclavin zu Pyroclavin. Der Austausch von NADPH gegen NADH führte zu einer geringen Verschiebung des Produktverhältnisses in Richtung des Pyroclavins.

Tab. 3-9: Umsatz von Chanoclavin-I zu Festuclavin und Pyroclavin in Gegenwart von NADPH und NADH. Die Reaktionsansätze (100 µl) enthielten 5 mM der Kofaktoren NAD⁺, FMN, NADH, NADPH, 1 mM Chanoclavin-I und 5 µg der rekombinanten Enzyme und wurden bei 30 °C für 15 h inkubiert. Die Substanzen wurden bei 282 nm detektiert.

Enzym-Kombinationen mit 5 µg Protein	Inkubation mit NADPH			Inkubation mit NADH		
	Chanoclavin-I Abnahme (%)	Produkt-Verhältnis		Chanoclavin-I Abnahme (%)	Produkt-Verhältnis	
		Festuclavin (4)	Pyroclavin (5)		Festuclavin (4)	Pyroclavin (5)
FgaOx3 _{pc} +FgaFS	43	95	5	23	88	12
FgaOx3 _{pc} +FgaFS _{pc}	18	79	21	3	72	28
FgaOx3 _{pc} +EasG	35	70	30	8	63	37
FgaOx3+FgaFS	26	96	4	48	90	10
FgaOx3+FgaFS _{pc}	25	79	21	9	74	26
FgaOx3+EasG	22	70	30	19	65	35

Tab. 3-10: Umsatz von Chanoclavin-I zu Festuclavin und Pyroclavin in Gegenwart von NADPH und NADH. Die Reaktionsansätze (100 µl) enthielten 5 mM der Kofaktoren NAD⁺, FMN, NADH, NADPH, 1 mM Chanoclavin-I und 10 µg der rekombinanten Enzyme und wurden bei 30 °C für 15 h inkubiert. Die Substanzen wurden bei 282 nm detektiert.

Enzym-Kombinationen mit 10 µg Protein	Inkubation mit NADPH			Inkubation mit NADH		
	Chanoclavin-I Abnahme (%)	Produkt-Verhältnis		Chanoclavin-I Abnahme (%)	Produkt-Verhältnis	
		Festuclavin (4)	Pyroclavin (5)		Festuclavin (4)	Pyroclavin (5)
FgaOx3 _{pc} +FgaFS	78	95	5	28	88	12
FgaOx3 _{pc} +FgaFS _{pc}	19	80	20	5	73	27
FgaOx3 _{pc} +EasG	70	72	28	12	63	37
FgaOx3+FgaFS	79	96	4	96	92	8
FgaOx3+FgaFS _{pc}	29	81	19	28	78	22
FgaOx3+EasG	75	71	29	63	66	34

Da die Verwendung von FgaOx3_{pc} und FgaFS_{pc} nicht wie erwartet zu Pyroclavin als Hauptprodukt der Reaktion führte (Kap. 3.8), wurde Fumigaclavin A erneut aus *P. commune* NRRL2033 isoliert. Die Kultivierung von *P. commune* NRRL2033 und die Isolierung von 1,8 mg Fumigaclavin A wurden von Beate Wollinsky durchgeführt. Vergleicht man die Re-

tentionszeiten der vier als Standard verwendeten Ergotalkaloide (Abb. 3-47 A) mit den Peaks des Kulturextrakts (Abb. 3-47 B), so wurde nur Fumigaclavin A bei 19,4 min nachgewiesen. Der Peak bei 19,4 min wurde durch ein ^1H -NMR-Spektrum sowie mittels NOESY-, HSQC- und HMBC-Spektren als (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A identifiziert (Matuschek *et al.*, 2012).

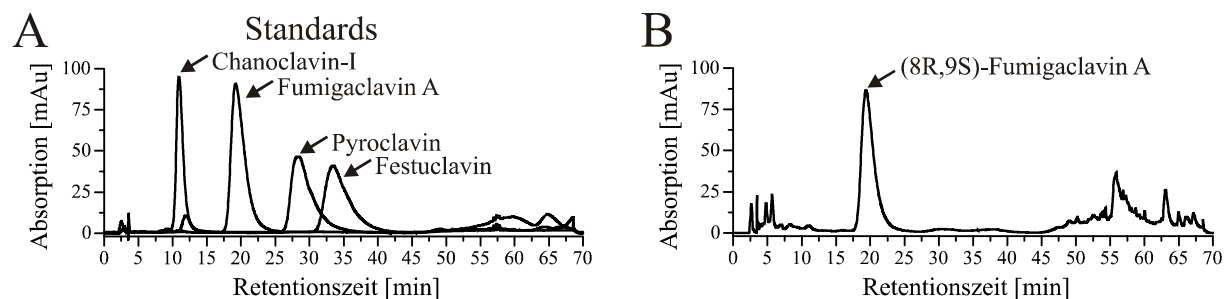


Abb. 3-47: HPLC-Chromatogramm des Kulturextraktes von *P. commune* NRRL2033 (B) unter Verwendung von verschiedenen Ergotalkaloiden als Standard (A). Die Substanzen wurden bei 282 nm detektiert.

4. Diskussion

4.1 Vorkommen von Ergotalkaloidgenclustern innerhalb der Ascomyceten

Die Ergebnisse zum Vorkommen der Ergotalkaloidgencluster innerhalb der Ascomyceten haben gezeigt, dass die Gene bislang in drei Familien der Ascomyceten, genauer der Pezizomyceten zu finden sind. Die Familie Clavicipitaceae gehört zur Klasse der Sordariomyceten und die Familien Trichocomaceae und Arthrodermataceae zu den Eurotiomyceten. Innerhalb der Clavicipitaceen wurde in zwei Arten der Gattung *Metarhizium* ebenfalls Ergotalkaloidgencluster identifiziert. Zurzeit gibt es jedoch noch keine Publikationen, die über die Isolierung von Ergotalkaloiden aus diesen Pilzen berichten. Die beiden Pilze der Gattung *Metarhizium* werden jedoch als biologische Insektizide eingesetzt. Da für Ergotalkaloide von einer nematiziden Wirkung berichtet wurde (Bacetty *et al.*, 2009), könnte daher ein Zusammenhang bestehen.

Die Sequenzvergleiche und auch die phylogenetischen Stammbäume ergaben eine nähere Verwandtschaft der Trichocomaceen und Arthrodermataceen untereinander als zu den Clavicipitaceen. Auffällig ist jedoch, dass innerhalb der Clavicipitaceen und Arthrodermataceen fast alle sequenzierten Stämme Ergotalkaloidgencluster aufweisen (Abb. 3-1). Innerhalb der Trichocomaceen konnten Ergotalkaloidgene nur in *A. fumigatus* und *P. commune* gefunden werden, obwohl zum Zeitpunkt der Analyse 138 sequenzierte Genome aus 53 verschiedenen Pilzfamilien zur Verfügung standen. Eine ähnliche Auffälligkeit gab es bei den Positionen und Orientierungen der orthologen Gene der Ergotalkaloidgencluster von *A. fumigatus* und *P. commune* im Vergleich zu den Genclustern der Clavicipitaceen und Arthrodermataceen (Abb. 3-2). Die Position und Orientierung der Gene in den Genclustern der Pilze der Clavicipitaceen und Arthrodermataceen waren innerhalb beider Familien identisch. Des Weiteren sind auch ähnliche Anordnungen der orthologen Gene in den Genclustern der Pilze zwischen diesen beiden Familien zu erkennen. Bei den Arthrodermataceen fehlen jedoch die orthologen Gene zu *easA* und *easG* und die Orthologen zu *ccsA* und *easF* haben in den Arthrodermataceen die Position getauscht. Das Gen *ccsA* liegt zusätzlich in der gegensätzlichen Orientierung vor. Die beiden Gencluster von *A. fumigatus* und *P. commune* hingegen unterscheiden sich grundlegend in den Positionen und Orientierungen der Gene untereinander und auch zu denen der Pilze der beiden anderen Familien. Es scheint in diesen beiden Stämmen evolutionär eine Reihe von Neuankordnungen durch Rekombination und Insertion stattgefunden zu haben. Der Grund, weshalb dies nur in der Familie der Trichocomaceen geschah, ist unbekannt.

Trotz der bereits aufgeführten Unterschiede zeigen die Multi-Proteinsequenzvergleiche der jeweiligen orthologen Proteine eine sehr hohe Anzahl an streng konservierten Aminosäureresten (Abb. 3-3 bzw. Anhang Abb. 6-1 bis Abb. 6-7). Eine Ausnahme stellen die FAD-abhängigen Oxidoreduktasen dar, die eine deutlich geringere Anzahl von streng konservierten Aminosäureresten aufweisen (Abb. 3-3 bzw. Anhang Abb. 6-3). Dies ist auch in den direkten

Proteinsequenzvergleichen zu sehen (Kap. 3.1.3 Tab. 3-1). Ein Grund für diese geringere Homologie konnte nicht gefunden werden. Bisher konnte aber auch noch keine FAD-abhängige Oxidoreduktase heterolog exprimiert und somit auch nicht biochemisch charakterisiert werden. Das Kapitel 4.3 geht näher auf die Untersuchungen der beiden FAD-abhängigen Oxidoreduktasen FgaOx1 aus *A. fumigatus* und EasE aus *C. purpurea* ein.

4.2 Untersuchungen zur Biosynthese der Alkaloide vom Fumitremorgin-Typ

Für die Funktion des Gens *ftmO* (AFUA_8G00260) aus dem putativen Biosynthesegencluster der Alkaloide vom Fumitremorgin-Typ von *A. fumigatus* Af293 sollten innerhalb dieser Arbeit zwei Hypothesen überprüft werden. Bei der ersten Hypothese bestand die Vermutung, dass FtmO als Prenyltransferase die Reaktion von Verruculogen zu Fumitremorgin A katalysiert. Mittels Sequenzvergleiche wurden jedoch keine Homologien zu bekannten Prenyltransferasen gefunden. Allerdings besitzt das Protein Homologien zu *Ankyrin repeat* Proteinen. Da *Ankyrin repeat* Proteine Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, sollte als zweite Hypothese überprüft werden, ob FtmO an der Reaktion von 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C zu Fumitremorgin B bzw. im darauffolgenden Schritt, der Reaktion von Fumitremorgin B zu Verruculogen, beteiligt ist.

Das Gen *ftmO* konnte erfolgreich in die Expressionsvektoren pQE-60 (pMM007) und auch in den Expressionsvektor pYES2/NT C (pMM005) kloniert und das Protein aus *E. coli* (pMM007) mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die Aufreinigung von FtmO aus *S. cerevisiae* (pMM005) blieb erfolglos. Mit dem aufgereinigten FtmO aus *E. coli* wurden sowohl die Prenyltransferase-Reaktionsansätze als auch die Inkubationen mit 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C bzw. Fumitremorgin B durchgeführt. Die HPLC-Chromatogramme enthielten jedoch keinen Hinweis auf eine enzymatische Aktivität von FtmO. Es besteht die Möglichkeit, dass das aus *E. coli* aufgereinigte FtmO inaktiv ist. Eine mögliche Ursache für die Inaktivität könnte z.B. eine falsche Faltung des eukaryotischen Proteins durch die prokaryotischen *E. coli*-Zellen sein. Leider konnte das Protein nicht aus *S. cerevisiae* aufgereinigt werden, so dass keine Überprüfung dieser Vermutung erfolgen konnte. Das Enzym könnte aber auch eine andere Funktion als bislang angenommen besitzen. Im Laufe der Untersuchungen dieser Arbeit konnten Kato *et al.* *ftmO* in *A. fumigatus* BW939 inaktivieren und zeigen, dass die Biosynthese von Fumitremorgin B und Verruculogen nicht beeinträchtigt wurde (Kato *et al.*, 2009). Da das Gen zudem direkt am Anfang des putativen Biosynthesegenclusters liegt (Abb. 1-11), kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Gen *ftmO* nicht zum putativen Biosynthesegencluster der Fumitremorgin-Typ Alkaloide von *A. fumigatus* Af293 gehört.

In detaillierten Sequenzanalysen wurden 17 *Ankyrin repeat* Domänen in dem Protein FtmO identifiziert (Anhang Abb. 6-18). Die *Ankyrin repeat* Domänen besitzen eine „L-förmige“

Struktur, die aus zwei α -Helixes gefolgt von einem *hairpin loop* gebildet wird (Gorina & Pavletich 1996). Die *Ankyrin repeat*-vermittelte Protein-Protein-Interaktion konnte bei anderen Proteinen durch *yeast two-hybrid*, Immunpräzipitation, *in vitro* Bindungs-Assays und GST *pull-down* Experimente bereits nachgewiesen werden (Mosavi *et al.*, 2004). Ähnliche Experimente könnten für FtmO in zukünftigen Untersuchungen angewendet werden.

4.3 Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von FgaOx1 bzw. EasE

Für den Biosyntheseschritt von DMA-L-Abrin nach Chanoclavin-I (Abb. 3-5) wurde eine mögliche Beteiligung des Gens *fgaOx1* (AFUA_2G18050) aus *A. fumigatus* Af293 postuliert (Kap. 3.4). Zur Untersuchung des Gens wurde, nachdem die direkte Amplifikation des Gens aus cDNA fehlschlug, eine Strategie zur Klonierung des Gens aus chemischer Synthese und Amplifikation aus cDNA entwickelt (Kap. 3.2.5.1). Mit dieser Strategie wurde das Gen *fgaOx1* im Plasmid pMM012 erhalten. Der über die chemische Synthese hergestellte Genabschnitt konnte später auch durch Amplifikation aus cDNA bestätigt werden. Da die Expression von *fgaOx1* (pMM012) erfolglos blieb, wurden weitere Expressionskonstrukte erstellt. Zusammenfassend wurde die Expression des Gens mit N- und C-terminalem Histidin-tag in *E. coli* (pMM012 und pMM013) und mit N-terminalem Histidin-tag in *S. cerevisiae* (pMM016) angestrebt. Das Ortholog von *fgaOx1* EasE wurde aus cDNA von *C. purpurea* amplifiziert und es wurde versucht, das Protein EasE-His₆ (pMM021) aus *E. coli* aufzureinigen. Schließlich wurden, nach einem Sequenzvergleich von FgaOx1 und EasE (Abb. 6-15), die ersten 134 Aminosäuren von FgaOx1 deletiert, um die Mutante FgaOx1 Δ 1-402 (pMM019) mit ähnlicher Proteinsequenzlänge wie EasE zu erzeugen. Alle Expressionsversuche der verschiedenen Proteine blieben jedoch erfolglos. Es konnte keines dieser Proteine mittels SDS-PAGE detektiert und auch keine Aktivität mittels HPLC nachgewiesen werden.

Weiterführende bioinformatische Untersuchungen der Proteinsequenz von FgaOx1 mit den Programmen TMHMM-2.0 und TMPred ergaben, dass möglicherweise zwei Membrandomänen (Aminosäure 5 bis 21 und 85 bis 105; Anhang Abb. 6-47) vorhanden sind. Sollte es sich bei den Domänen tatsächlich um Membrandomänen handeln, könnte dies eine Erklärung für die fehlgeschlagenen Expressions- und Aufreinigungsversuche sein. Daher könnten in nachfolgenden Arbeiten erneute Expressionsversuche von *fgaOx1* mit anschließender Optimierung der Aufreinigung im Hinblick auf ein Membranprotein durchgeführt werden.

Während der Analysen der Intron-Exon-Struktur im Rahmen der Untersuchungen der Ergotalkaloidgencluster innerhalb der Ascomyceten (Kap. 3.1 bzw. Kap. 4.1) wurde durch Sequenzvergleiche von *easE* aus *C. purpurea* mit *fgaOx1* aus *A. fumigatus* festgestellt, dass für *easE* ein alternatives Startcodon gewählt werden kann. Das in dieser Arbeit vorhergesagte EasE Protein weist im Gegensatz zu dem EasE der NCBI-Datenbank einen längeren N-Terminus auf und es ergibt sich eine höhere Homologie (44 % statt 39 %) zu FgaOx1 (Anhang Abb. 6-15). Einen Hinweis darauf, dass die neue Intron-Exon-Struktur von EasE

wahrscheinlicher ist, zeigte auch die Analyse von 18 weiteren orthologen Genen. In allen Fällen führten die Wahl des neuen Startcodons sowie die alternativen Intron-Exon-Strukturen zu putativen Proteinen mit hohen Homologien. Dies zeigte der Multi-Proteinsequenzvergleich (Anhang Abb. 6-3). Eine Bestätigung dieser neu vorgeschlagenen *easE*-Gensequenz soll in weiterführenden Arbeiten durch die Amplifikation des Gens aus cDNA von *C. purpurea* erfolgen.

Für das EasE mit der neuen Sequenz wurde mit den Programmen TMHMM-2.0 und TMPred eine Membrandomäne vorhergesagt (Aminosäure 3 bis 19) (Anhang Abb. 6-47). Daher sollte bei nachfolgenden Arbeiten auch für dieses Protein eine Optimierung der Aufreinigung im Hinblick auf ein potentiell Membranprotein durchgeführt werden. Die Löslichkeit des neuen EasE Proteins könnte besser sein, als die von FgaOx1, da nur eine statt zwei Membrandomänen vorhergesagt werden.

Das mit der erstellten Deletionsmutante FgaOx1 Δ 1-402 kein Protein erhalten wurde, könnte mehrere Ursachen haben. Grundsätzlich kann ein Eingriff in die Primärsequenz eines Proteins zur vollständigen Unlöslichkeit führen. Es wurden aber wahrscheinlich zu viele Aminosäuren von FgaOx1 deletiert. Nach den aktuellen Ergebnissen wird zur Entfernung der zwei Membrandomänen von FgaOx1 aus *A. fumigatus* eine kürzere Deletion vorgeschlagen. Beispielsweise wäre die Deletion der Basen 1 bis 315 (entspricht den Aminosäuren 1 bis 105) eine Möglichkeit. Natürlich kann auch für die mögliche Mutante FgaOx1 Δ 1-315 nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein durch den Eingriff unlöslich wird bzw. katalytisch wichtige Aminosäuren entfernt werden.

4.4 Reaktionsmechanismus von EasG in Gegenwart von reduziertem Glutathion für die Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Agroclavin

Es sollte untersucht werden, ob die Proteine EasA und EasG aus *C. purpurea* in Analogie zu ihren Orthologen FgaOx3 und FgaFS aus *A. fumigatus*, die die Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin katalysieren (Wallwey *et al.*, 2010b), die Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Agroclavin katalysieren. Beide Proteine wurden chemisch synthetisiert. Die Sequenzen von *easA* (AJ703809.1) und *easG* (AY836771.1) von *C. purpurea* P1 wurden aus der NCBI-Datenbank erhalten. Nach der Umklonierung in den Expressionsvektor und Expression der beiden Gene in *E. coli* konnten beide Proteine mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Bei den Reaktionsansätzen mit Chanoclavin-I-Aldehyd als Substrat, NADH bzw. NADPH und FNM als Kofaktoren sowie EasA und EasG konnte jedoch keine Agroclavin-Bildung detektiert werden. Stattdessen zeigten weitere Untersuchungen, dass EasA inaktiv ist und EasG in der Gegenwart von GSH die Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Agroclavin katalysiert.

Auf Grundlage der in Kap. 3.6 beschriebenen Ergebnisse der Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Agroclavin, wurde der in Abb. 4-1 gezeigte Reaktionsmechanismus postuliert. Die Ergebnisse in Kap. 3.6.4 zeigten, dass zunächst eine nicht-enzymatische Reaktion zwischen Chanoclavin-I-Aldehyd und dem verwendeten Reduktionsmittel stattfand. Am plausibelsten ist im ersten Schritt der Angriff des Thiolat-Anions auf das C-9 von Chanoclavin-I-Aldehyd. Entsprechende Reaktionen von Thiolat-Anionen auf α,β -ungesättigte Aldehyde wurden in der Literatur hinreichend beschrieben (Esterbauer *et al.*, 1976; Koval 2007). Der Reaktionsansatz in Abb. 3-34 H, in dem L-Ascorbinsäure anstatt GSH verwendet wurde, zeigt, dass eine Thiolgruppe für die Reaktion benötigt wird. Eine weitere Bestätigung des postulierten Mechanismus lieferten die Experimente, in denen das GSH erfolgreich durch 2-Mercaptoethanol und DTT ersetzt wurde (Abb. 3-36). Die Reaktion des Reduktionsmittels mit Chanoclavin-I-Aldehyd ermöglicht die Rotation der Einfachbindung zwischen C-8 und C-9.

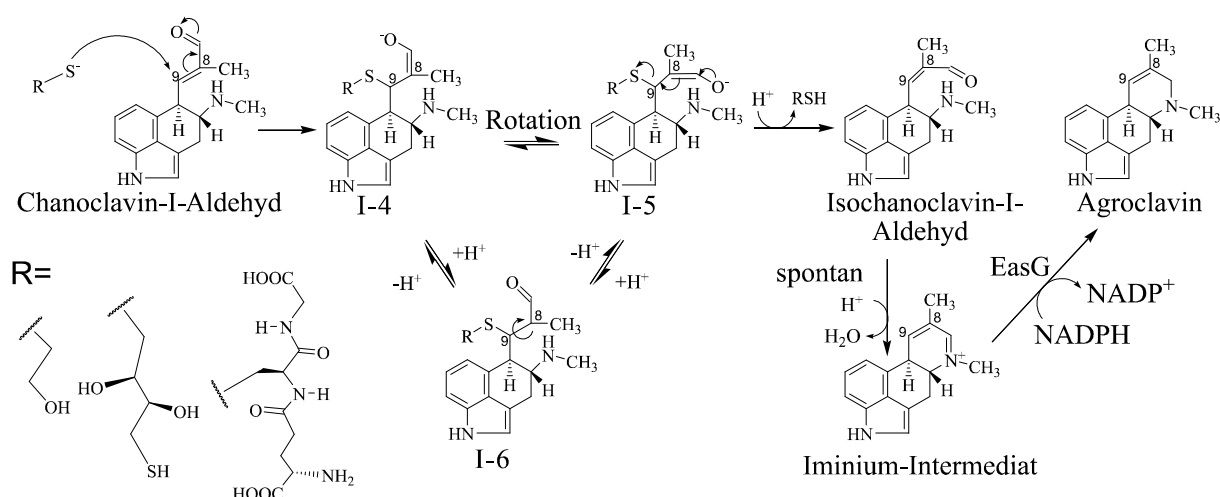


Abb. 4-1: Postulierter Reaktionsmechanismus für die Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Agroclavin über ein nicht-enzymatisches Intermediat mit GSH und der Reduktion eines Iminium-Intermediats durch EasG.

Durch Protonierung bzw. Deprotonierung können die Intermediate I-4 bis I-6 entstehen. Das Intermediat I-6 aus Chanoclavin-I-Aldehyd-DTT konnte mittels MS-Analyse nachgewiesen werden (Kap. 3.6.4). Hierdurch wurde ebenfalls die chemische Reaktion zwischen dem Reduktionsmittel und Chanoclavin-I-Aldehyd bewiesen. Wird das Reduktionsmittel von dem Intermediat I-5 durch Protonierung eliminiert, entsteht Isochanoclavin-I-Aldehyd. Dieses kann durch einen spontanen Ringschluss in einer Kondensationsreaktion zu einem Iminium-Intermediat reagieren. Das Iminium-Intermediat wird schließlich von EasG unter NADPH-Verbrauch zu Agroclavin reduziert. Daher fungiert EasG in Gegenwart von GSH als Imin-reduktase.

4.5 Untersuchungen zur Kontrolle der Stereochemie bei der Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin und Pyroclavin

Für die Untersuchungen der Kontrolle der Stereochemie in den Ergotalkaloidbiosynthesewegen in *A. fumigatus* und *P. commune* wurde eine Analyse der Intron-Exon-Struktur der Gene *fgaOx3_{pc}* und *fgaFS_{pc}* durchgeführt. Die DNA-Sequenz des Genclusters stammt aus dem Cosmid 28D7, das in einer vorherigen Arbeit von Inge Unsöld erstellt wurde (Unsöld 2006). Nach erfolgter Umklonierung und Expression der beiden Gene in *E. coli*, konnten beide Proteine mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die Analysen der Reaktionsansätze von Chanoclavin-I-Aldehyd, das enzymatisch mit FgaDH aus Chanoclavin-I erhalten wurde, mit EasG und FgaOx3 bzw. FgaOx3_{pc} und FgaFS_{pc} zeigten, dass nicht nur Festuclavin, sondern auch sein Stereoisomer Pyroclavin bei der Reaktion entsteht. Zuvor hatten Wallwey *et al.* nur gezeigt, dass FgaOx3 und FgaFS zusammen die Umsetzung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin katalysieren (Wallwey *et al.*, 2010b).

4.5.1 Postulierter Reaktionsmechanismus

Mit Hilfe der in Kap. 3.7 beschriebenen Ergebnisse wurde der in Abb. 4-2 gezeigte Reaktionsmechanismus für die Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin und Pyroclavin postuliert. Im ersten Schritt des Reaktionsmechanismus katalysiert FgaOx3 bzw. FgaOx3_{pc} die Reduktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu dem Intermediat I-1, wobei NADPH als Kofaktor fungiert. Die Zugabe von FMN war nötig, um FgaOx3 bzw. FgaOx3_{pc} von der Apo- in die Holo-Form zu überführen. Durch die Reduktion der Doppelbindung zwischen C-8 und C-9 kann eine Rotation um die entstandene Einfachbindung erfolgen, die über eine Kondensationsreaktion spontan zu einem Ringschluss führt.

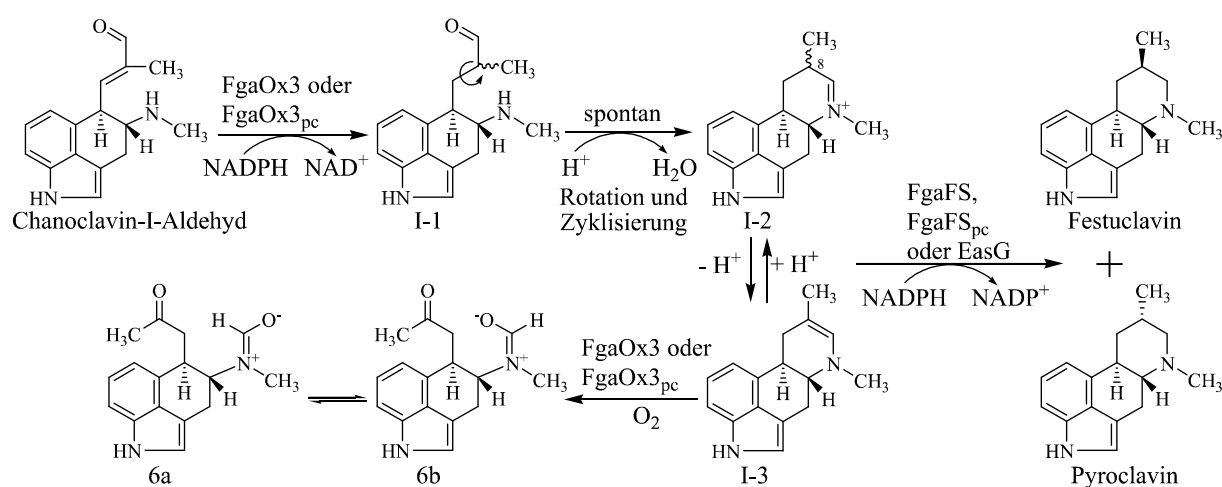


Abb. 4-2: Postulierter Reaktionsmechanismus für die Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin und Pyroclavin, modifiziert nach (Wallwey *et al.*, 2010b).

Das entstandene Intermediat I-2 steht über Protonierung und Deprotonierung im Gleichgewicht mit dem Intermediat I-3. Die Methylgruppe an C-8 des Iminium-Intermediats I-2 liegt daher sowohl in α - als auch in β -Konfiguration vor. Die Reduktion des Iminium-Intermediats durch FgaFS, FgaFS_{pc} oder EasG führt schließlich zur Bildung von Festuclavin und Pyroclavin. Für diesen Reaktionsschritt benötigen die Iminreduktasen den Kofaktor NADPH bzw. NADH. Analog zu den Ergebnissen von FgaOx3 wurde auch mit dem Protein FgaOx3_{pc} aus *P. commune* NRRL2033 die Entstehung der beiden Isomeren **6a** und **6b** beobachtet (Wallwey *et al.*, 2010b; Xie *et al.*, 2011).

Für die Reaktion von FgaOx3 und FgaFS in *A. fumigatus*, die von Christiane Wallwey untersucht wurde (Wallwey *et al.*, 2010b), blieb in der damaligen Arbeit die Frage offen, ob FgaFS die Stereochemie an C-8 festlegt, oder ob bereits FgaOx3 die Stereochemie der Reaktion bestimmt. In diesem Zusammenhang postulierten bereits Hassam *et al.*, dass eine Isomerisierung der Doppelbindung zwischen C-8 und C-9 erfolgen muss, bevor die Zyklisierung stattfindet (Hassam & Floss 1981). Die Gruppen um O'Connor und Panaccione postulierten zusätzlich, dass die Stereochemie bereits bei der Reduktion von Chanoclavin-I-Aldehyd durch FgaOx3 festgelegt wird (Cheng *et al.*, 2010a; Cheng *et al.*, 2010b; Coyle *et al.*, 2010). Diese Hypothese konnte jedoch nicht direkt durch Einzelinkubationen beantwortet werden, da die Inkubation von Chanoclavin-I-Aldehyd mit FgaOx3 zu der beschriebenen Entstehung des Nebenprodukts führt, welches nicht von FgaFS als Substrat akzeptiert wird. Weiterhin war es nicht möglich, mittels HPLC ein Intermediat zu detektieren, das FgaFS als Substrat dienen könnte.

Die Ergebnisse in Abb. 3-46 bzw. Tab. 3-9 (Kap. 3.8.2) zeigen jedoch eindeutig, dass ein Austausch von FgaOx3 durch FgaOx3_{pc} keine signifikanten Auswirkungen auf das Verhältnis von Festuclavin zu Pyroclavin hat. Das Verhältnis wird jedoch direkt durch FgaFS, FgaFS_{pc} oder EasG bestimmt. Die Produktverhältnisse zwischen Festuclavin und Pyroclavin werden daher stereoselektiv von der jeweiligen Iminreduktase festgelegt und nicht bereits im ersten Reduktionsschritt bestimmt. Somit wurde der von Cheng *et al.* postulierte Reaktionsmechanismus (Cheng *et al.*, 2010a; Cheng *et al.*, 2010b) widerlegt.

4.5.2 Verzweigungspunkte der Ergotalkaloidbiosynthesewege von *C. purpurea*, *A. fumigatus* und *P. commune*

Chanoclavin-I-Aldehyd stellt den Verzweigungspunkt in den Ergotalkaloidbiosynthesewegen zwischen *C. purpurea* und *A. fumigatus* dar (Abb. 4-3). Innerhalb dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Entstehung von Agroclavin durch EasG in Gegenwart von GSH katalysiert wird (Kap. 3.6). Dabei führt die Reaktion von GSH mit Chanoclavin-I-Aldehyd zu einer Isomerisation und EasG katalysiert anschließend die Reduktion des Iminium-Intermediats. In *A. fumigatus* führen zwei Reduktionen zu Festuclavin und Pyroclavin. Dabei bestimmt die jeweilige Iminreduktase (FgaFS, FgaFS_{pc} oder EasG) das Verhältnis der beiden Stereoisomere zueinander (Kap. 4.5.1). Daher können FgaFS, FgaFS_{pc} und EasG als Schlüssel-Enzyme für

die Verzweigung in den Ergotalkaloidbiosynthesewegen zwischen *C. purpurea* und *A. fumigatus* bzw. *P. commune* angesehen werden, nicht aber die *old yellow enzymes*. Die Abb. 4-3 gibt einen Überblick über die putativen Ergotalkaloidbiosynthesewege in *A. fumigatus*, *P. commune* und *C. purpurea* unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit wieder.

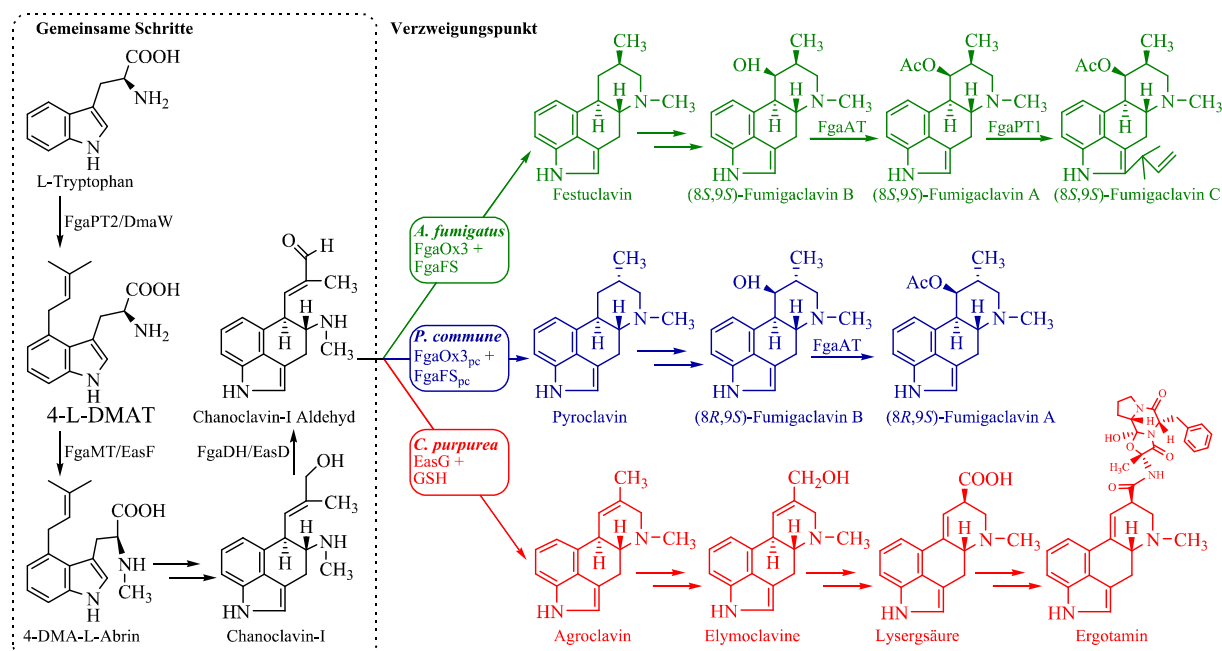


Abb. 4-3: Verzweigung der putativen Ergotalkaloidbiosynthesewege in *A. fumigatus*, *P. commune* und *C. purpurea*.

Nach diesen Ergebnissen könnte man erwarten, dass das Ausschalten von FgaOx3 in *A. fumigatus* zu der Bildung von Agroclavin führen würde. Dies ist wahrscheinlich, da auch in *A. fumigatus* intrazelluläres GSH vorhanden ist und gezeigt werden konnte, dass FgaFS in Gegenwart von GSH Chanoclovin-I-Aldehyd zu Agroclavin umsetzt (Kap. 3.6.1 Abb. 3-34 I). Coyle *et al.* erzeugten jedoch eine Mutante des *A. fumigatus* Isolats FGSC A1141, in der FgaOx3 ausgeschaltet und die Akkumulation von Chanoclovin-I und Chanoclovin-I-Aldehyd detektiert wurde (Coyle *et al.*, 2010). Weiterhin wurde das Gen *easA* aus *C. purpurea* in die *A. fumigatus* Mutante eingebracht, was zu der Bildung von Agroclavin führte. Aus diesen Ergebnissen folgerten die Autoren, dass FgaOx3 die Kontrolle über die Biosynthesewege zwischen *A. fumigatus* und *C. purpurea* besitzt (Coyle *et al.*, 2010).

Es ergibt sich daher ein scheinbarer Widerspruch zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den *in vivo* Ergebnissen von Coyle *et al.*, da die *A. fumigatus* Mutante bedingt durch das Ausschalten von *fgaOx3* eigentlich Agroclavin hätte produzieren müssen. Eine mögliche Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch wäre, dass durch das Ausschalten des Gens *fgaOx3* gleichzeitig auch die Expression von *fgaFS* beeinträchtigt wurde. Dies erscheint wahrscheinlich, da einerseits beide Gene im Gencluster in direkter Nachbarschaft stehen. Andererseits

wäre eine gemeinsame Regulation der beiden Gene denkbar, da die *in vitro* Ergebnisse das enge Zusammenspiel beider Proteine bei der Katalyse gezeigt haben. Das Einbringen des Gens *easA* in die Mutante könnte die Expression von *fgaFS* wieder ermöglicht haben, was dann zur Produktion von Agroclavin führte. In der Arbeit von Coyle *et al.* hätte zwangsläufig ein Nachweis der Expression von *fgaFS* erfolgen müssen, um gesicherte Aussagen treffen zu können. Kontrolliert wurden aber leider nur das Ausschalten und die Komplementierung von *fgaOx3* bzw. *easA* mittels PCR. Das Ausschalten von *fgaOx3* in der Mutante könnte auch generell die Biosynthese der Ergotalkaloide gestört haben.

Ein Anhaltspunkt dafür, dass EasA tatsächlich auch *in vivo* in *C. purpurea* nicht mehr aktiv ist, ergibt sich auch aus dem strukturellen Vergleich von Agroclavin und Festuclavin. In Festuclavin findet sich keine Doppelbindung zwischen C-8 und C-9, wodurch als zweiter Unterschied ein Chiralitätszentrum in C-8 entsteht. Daher müssen für die Umwandlung von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Festuclavin zwei Reduktionen erfolgen, die jeweils von einem Enzym (FgaOx3 und FgaFS) katalysiert werden. In Agroclavin entfällt jedoch eine Reduktion durch die bestehende Doppelbindung zwischen C-8 und C-9. Daher kann davon ausgegangen werden, dass auch nur ein Enzym (EasG) benötigt wird.

In einer weiteren Publikation von Cheng *et al.* wurde ein Ortholog von FgaOx3 und EasA aus dem Pilz *Neotyphodium lolii* untersucht, welches als EasA_Nl bezeichnet wurde (Cheng *et al.*, 2010b). Es konnte gezeigt werden, dass EasA_Nl zusammen mit FgaFS die Reaktion von Chanoclavin-I-Aldehyd zu Agroclavin katalysiert. Daher fungiert EasA_Nl als Isomerase, vergleichbar mit der in dieser Arbeit beschriebenen Rolle des Glutathions. Weiterhin wurde Phe176 in EasA_Nl zu Tyr176 mutiert, wodurch die Isomerase-Aktivität teilweise in eine Reduktase-Aktivität umgewandelt wurde. Die Tatsache, dass EasA_N176Y sowohl Agroclavin als auch Festuclavin produzierte, wurde nicht kommentiert. Eine weitere offene Frage blieb das Ergebnis, dass die Reduktase-Aktivität von FgaOx3 durch eine analoge Mutation von Tyr178 zu Phe178 nicht in eine Isomerase-Aktivität überführt werden konnte. Innerhalb der Untersuchungen wurde auch EasA von *C. purpurea* in *E. coli* aufgereinigt. Da auch dieses Protein inaktiv war, wurden die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Die Autoren führten die Inaktivität auf das Fehlen des Kofaktors FMN im aufgereinigtem Protein zurück. Überprüft wurde das Vorhandensein des Kofaktors mittels UV/Vis-Spektroskopie.

Dass die Inaktivität von EasA durch das Fehlen von FMN hervorgerufen wird, wäre vorstellbar, jedoch führte die Zugabe von FMN zu dem aufgereinigten Proteinen im Falle der Orthologen FgaOx3 und FgaOx3_{pc} zu aktiven Proteinen. Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei EasA die Zugabe von FMN nicht dazu geführt hat, das Protein von der Apo- in die Holo-Form zu überführen. Es wäre aber auch evolutionär vorstellbar, dass sich die *old yellow enzymes* FgaOx3 und FgaOx3_{pc} in den Trichocomaceen von den Clavicipitaceen abgespalten und anstelle der Isomerase-Aktivität eine Reduktase-Aktivität ausgebildet haben. In *C. purpurea* hingegen könnte die Isomerase-Aktivität von EasA verlorengegangen sein, da

intrazelluläres GSH anstelle von EasA die nötige Isomerisierung von Chanoclavin-I-Aldehyd ermöglichte.

4.5.3 Festlegung der Stereochemie von (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin C in *A. fumigatus* und (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A in *P. commune*

Nicht vollständig aufgeklärt werden konnte die Frage, ob FgaFS und FgaFS_{pc} für die Stereochemie von (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin C in *A. fumigatus* und (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A in *P. commune* verantwortlich sind. FgaFS bildet bei der Inkubation mit NADPH (Tab. 3-9) ca. 95 % Festuclavin, das die gleiche Stereochemie wie (8*S*,9*S*)-Fumigaclavin C besitzt. FgaFS_{pc} hätte als Hauptprodukt demnach aber Pyroclavin bilden müssen, dessen Stereochemie der des (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A entspricht, das aus *P. commune* isoliert wurde. Es wurden bei den Inkubationen mit FgaFS_{pc} zwar größere Mengen an Pyroclavin detektiert (ca. 21 % s. Tab. 3-9), Festuclavin blieb aber mit 79 % das Hauptprodukt. Daher wurde zur Überprüfung der Stereochemie das Fumigaclavin A aus *P. commune* erneut isoliert. Die Analyse mittels NMR-Spektroskopie ergab eindeutig (8*R*,9*S*)-Konfiguration (Matuschek *et al.*, 2012).

Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse wäre, dass in *P. commune* tatsächlich Festuclavin und Pyroclavin gebildet werden. Im nächsten Biosyntheseschritt, der sehr wahrscheinlich durch FgaP450-2 in *A. fumigatus* bzw. FgaP450 in *P. commune* katalysiert wird, findet eine Hydroxylierung an C-9 statt. FgaP450 könnte als Substrat möglicherweise nur Pyroclavin akzeptieren, so dass letztlich nur (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin A gebildet wird. Diese Hypothese erscheint aber unwahrscheinlich, da in diesem Fall Festuclavin akkumulieren würde, was in dem Chromatogramm des Kulturextrakts (Abb. 3-47) nicht beobachtet wurde. Es wäre natürlich möglich, dass in *P. commune* Festuclavin direkt wieder abgebaut oder in Pyroclavin umgewandelt wird, was aus Sicht des Pilzes jedoch energetisch ineffektiv wäre. Außerdem könnte man erwarten, dass evolutionär eine Optimierung von FgaFS_{pc} in Richtung der Bildung von Pyroclavin stattfinden würde. Das eine Erhöhung des Pyroclavin-Anteils möglich ist, zeigt das orthologe Protein EasG aus *C. purpurea*, mit dem 30 % Pyroclavin erhalten wurde (Tab. 3-9). FgaP450 könnte aber auch Festuclavin und Pyroclavin als Substrat akzeptieren und die Stereochemie während der Hydroxylierung wieder aufheben und anschließend als Hauptprodukt (8*R*,9*S*)-Fumigaclavin B bilden. Es stellt sich jedoch die Frage, warum FgaFS und FgaFS_{pc} unterschiedliche Verhältnisse der beiden Stereoisomere bilden bzw. weshalb nicht beide Stereoisomere zu gleichen Anteilen gebildet werden. Erneut deuten die Ergebnisse des Enzyms EasG, dessen Produkt Agroclavin durch die Doppelbindung zwischen C-8 und C-9 keine Stereochemie an C-9 aufweist, darauf hin, dass die Stereoselektivität evolutionär verloren gegangen ist. Weitere Untersuchungen sind an dieser Stelle erforderlich, um die Hypothesen bestätigen oder widerlegen zu können. Schließlich wäre es auch möglich, dass FgaFS_{pc} *in vivo* eine andere Stereoselektivität als *in vitro* zeigt, und diese möglicherweise durch die Beteiligung von weiteren Proteinen, anderen Kofaktoren oder anderen intrazellulären Bedingungen beeinflusst wird.

5. Literaturverzeichnis

- Abe, M. (1951).** Research on ergot fungus, 9: isolation and properties of an alkaloid "agroclavine" produced by ergot fungus in saprophytic cultures. *Ann. Rep. Takeda Res. Lab.* **10**, 145-152.
- Abe, M., Yamano, T., Kozu, Y. & Kusumoto, M. (1952).** A new water-soluble ergot alkaloid, elymoclavine. *J. Agr. Chem. Soc.* **25**, 458-459.
- Arcamone, F., Chain, E. B., Ferretti, A., Minghetti, A., Pennella, P., Tonolo, A. & Vero, L. (1961).** Production of a new lysergic acid derivative in submerged culture by a strain of *Claviceps paspali* Stevens & Hall. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **155**, 26-54.
- Bacetty, A. A., Snook, M. E., Glenn, A. E., Noe, J. P., Hill, N., Culbreath, A., Timper, P., Nagabhyru, P. & Bacon, C. W. (2009).** Toxicity of endophyte-infected tall fescue alkaloids and grass metabolites on *Pratylenchus scribneri*. *Phytopathology* **99**, 1336-1345.
- Bhabhra, R., Miley, M. D., Mylonakis, E., Boettner, D., Fortwendel, J., Panepinto, J. C., Postow, M., Rhodes, J. C. & Askew, D. S. (2004).** Disruption of the *Aspergillus fumigatus* gene encoding nucleolar protein CgrA impairs thermotolerant growth and reduces virulence. *Infect. Immun.* **72**, 4731-4740.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bundesamt (2006).** Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *Neosartorya fischeri*, *Aspergillus amstelodami* und *Penicillium commune* (Az.6790-05-03-32). *Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*.
- Cheng, J. Z., Coyle, C. M., Panaccione, D. G. & O'Connor, S. E. (2010a).** A role for old yellow enzyme in ergot alkaloid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 1776-1777.
- Cheng, J. Z., Coyle, C. M., Panaccione, D. G. & O'Connor, S. E. (2010b).** Controlling a structural branch point in ergot alkaloid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 12835-12837.
- Cole, R. J., Dorner, J. W., Cox, R. H. & Raymond, L. W. (1983).** Two classes of alkaloid mycotoxins produced by *Penicillium crustosum* Thom isolated from contaminated beer. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 655-657.
- Cole, R. J., Kirksey, J. W., Dorner, J. W., Wilson, D. M. et al. (1977a).** Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* isolated from silage. *Ann. Nutr. Aliment.* **31**, 685-691.
- Cole, R. J., Kirksey, J. W., Dorner, J. W., Wilson, D. M. et al. (1977b).** Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. *J. Agr. Food Chem.* **25**, 826-830.
- Coyle, C. M., Cheng, J. Z., O'Connor, S. E. & Panaccione, D. G. (2010).** An old yellow enzyme gene that controls the branch point between *Aspergillus fumigatus* and *Claviceps purpurea* ergot alkaloid pathways. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3898-3903.

- Cui, C. B., Kakeya, H., Okada, G., Onose, R., Ubukata, M., Takahashi, I., Isono, K. & Osada, H. (1995).** Tryprostatins A and B, novel mammalian cell cycle inhibitors produced by *Aspergillus fumigatus*. *J. Antibiot.* **48**, 1382-1384.
- Esterbauer, H., Ertl, A. & Scholz, N. (1976).** The reaction of cysteine with α,β -unsaturated aldehydes. *Tetrahedron* **32**, 285-289.
- Flieger, M., Sedmera, P., Novák, J., Cvak, L., Stuchlík, J. & Zapletal, J. (1991).** Degradation products of ergot alkaloids. *J. Nat. Prod.* **54**, 390-395.
- Flieger, M., Wurst, M. & Shelby, R. (1997).** Ergot alkaloids--sources, structures and analytical methods. *Folia Microbiol. (Praha)* **42**, 3-30.
- Floss, H. G. (1976).** Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds. *Tetrahedron* **32**, 873-912.
- Floss, H. G., Tscheng-Lin, M., Chang, C., Naidoo, B., Balir, G. E., Abou-Chaar, C. I. & Cassady, J. M. (1974).** Biosynthesis of ergot alkaloids. Studies on the mechanism of the conversion of chanoclavine-I into tetracyclic ergolines. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 1898-1909.
- Frisvad, J. C. (1989).** The connection between the *Penicillia* and *Aspergilli* and mycotoxins with special emphasis on misidentified isolates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **18**, 452-467.
- Frisvad, J. C., Rank, C., Nielsen, K. F. & Larsen, T. O. (2009).** Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **47**, S53-S71.
- Ge, H. M., Yu, Z. G., Zhang, J., Wu, J. H. & Tan, R. X. (2009).** Bioactive alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*. *J. Nat. Prod.* **72**, 753-755.
- Gorina, S. & Pavletich, N. P. (1996).** Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science* **274**, 1001-1005.
- Gröger, D. & Floss, H. G. (1998).** Biochemistry of ergot alkaloids - Achievements and challenges. *The Alkaloids, Chem. Biol.* **50**, 171-218.
- Grundmann, A. (2008).** Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Biosynthese von Mycotoxinen aus *Aspergillus fumigatus*. *Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Grundmann, A., Kuznetsova, T., Afiyatullo, S. S. & Li, S.-M. (2008).** FtmPT2, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, catalyses the last step in the biosynthesis of fumitremorgin B. *Chembiochem* **9**, 2059-2063.
- Grundmann, A. & Li, S.-M. (2005).** Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **151**, 2199-2207.
- Haarmann, T., Rolke, Y., Giesbert, S. & Tudzynski, P. (2009).** Ergot: from witchcraft to biotechnology. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 563-577.
- Hänsel, R. & Pertz, H. (2009).** Alkaloide. *Pharmakognosie - Phytopharmazie* hg. von Hänsel, R. und Sticher, O. **9. Auflage**, 1220-1386.

- Hassam, S. B. & Floss, H. G. (1981).** Biosynthesis of ergot alkaloids. Incorporation of (17R)-(17-³H)- and (17S)-(17-³H) chanoclavine-I into elymoclyvine by *Claviceps*. *J. Nat. Prod.* **44**, 756-758.
- Hermansen, K., Frisvad, J. C., Emborg, C. & Hansen, J. (1984).** Cyclopiazonic acid production by submerged cultures of *Penicillium* and *Aspergillus* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**, 253-261.
- Hofmann, A., Brunner, R., Kobel, H. & Brack, A. (1957).** Neue Alkaloide aus der saprophytischen Kultur des Mutterkornpilzes von *Pennisetum typhoideum* Rich. 42. Mitteilung über Mutterkornalkaloide. *Helv. Chim. Acta* **40**, 1358-1373.
- Hofmann, K. & Stoffel, W. (1993).** TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**, 166-167.
- Hohl, T. M. & Feldmesser, M. (2007).** *Aspergillus fumigatus*: Principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot. Cell* **6**, 1953-1963.
- Horie, Y. & Yamazaki, M. (1981).** Productivity of tremorgenic mycotoxins, fumitremorgins A and B in *Aspergillus fumigatus* and allied species. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **22**, 113-119.
- Hospenthal, D. R., Kwon-Chung, K. J. & Bennett, J. E. (1998).** Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. *Med. Mycol.* **36**, 165-168.
- Hulvova, H., Galuszka, P., Frebortova, J. & Frebort, I. (2012).** Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnol. Adv.* **In press**.
- Jacobs, W. A. & Gould, R. G., Jr. (1937).** The synthesis of substances related to lysergic acid. *Science* **85**, 248-249.
- Jahn, B., Koch, A., Schmidt, A., Wanner, G., Gehringer, H., Bhakdi, S. & Brakhage, A. A. (1997).** Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infect. Immun.* **65**, 5110-5117.
- Jain, H. D., Zhang, C., Zhou, S., Zhou, H. et al. (2008).** Synthesis and structure-activity relationship studies on tryprostatin A, a potent inhibitor of breast cancer resistance protein. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 4626-4651.
- Kato, N., Suzuki, H., Takagi, H., Asami, Y. et al. (2009).** Identification of cytochrome P450s required for fumitremorgin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **10**, 920-928.
- Kawai, K., Nozawa, K., Yamaguchi, T., Nakajima, S. & Udagawa, S. (1992).** Two chemotypes of *Penicillium crustosum* based on the analysis of indolic components. *Mycotoxins* **36**, 19-24.
- Keller, N. P. & Hohn, T. M. (1997).** Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* **21**, 17-29.
- Khalidi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H. & Fedorova, N. D. (2010).** SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal. Genet. Biol.* **47**, 736-741.

- Kim, M. K., Kim, H. S., Lee, I. K. & Park, K. G. (2012).** Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: a review. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, 509437.
- Koval, I. V. (2007).** Reactions of thiols. *Russian J. Org. Chem.* **43**, 319-346.
- Krska, R. & Crews, C. (2008).** Significance, chemistry and determination of ergot alkaloids: A review. *Food Addit. Contam* **25**, 722-731.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Larsen, T. O., Smedsgaard, J., Nielsen, K. F., Hansen, M. A., Samson, R. A. & Frisvad, J. C. (2007).** Production of mycotoxins by *Aspergillus lentulus* and other medically important and closely related species in section Fumigati. *Med. Mycol.* **45**, 225-232.
- Latge, J. P. (1999).** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 310-350.
- Li, S.-M. (2011).** Genome mining and biosynthesis of fumitremorgin-type alkaloids in ascomycetes. *J. Antibiot.* **64**, 45-49.
- Lorenz, N., Haarmann, T., Pazoutova, S., Jung, M. & Tudzynski, P. (2009).** The ergot alkaloid gene cluster: Functional analyses and evolutionary aspects. *Phytochemistry* **70**, 1822-1932.
- Lovell, B. V. & Marmura, M. J. (2010).** New therapeutic developments in chronic migraine. *Curr. Opin. Neurol.* **23**, 254-258.
- Ma, H. Y., Song, Y. C., Mao, Y. Y., Jiang, J. H., Tan, R. X. & Luo, L. (2006).** Endophytic fungal metabolite fumigaclavine C causes relaxation of isolated rat aortic rings. *Planta Med.* **72**, 387-392.
- Maier, W., Erge, D. & Gröger, D. (1980).** Mutational biosynthesis in a strain of *Claviceps purpurea*. *Planta Med.* **40**, 104-108.
- Maiya, S., Grundmann, A., Li, S.-M. & Turner, G. (2006).** The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. *Chembiochem.* **7**, 1062-1069.
- Matuschek, M., Wallwey, C., Wollinsky, B., Xie, X. & Li, S.-M. (2012).** *In vitro* conversion of chanoclavine-I aldehyde to the stereoisomers festuclavine and pyroclavine controlled by the second reduction step. *RSC Advances* **2**, 3662-3669.
- Millner, P. D., Marsh, P. B., Snowden, R. B. & Parr, J. F. (1977).** Occurrence of *Aspergillus fumigatus* during composting of sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 765-772.
- Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C. & Peng, Z. Y. (2004).** The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* **13**, 1435-1448.
- Nielsen, P. V., Beuchat, L. R. & Frisvad, J. C. (1988).** Growth of and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1504-1510.

- Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J., Wortman, J. R. et al. (2005).** Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**, 1151-1156.
- Ninomiya, I., Kiguchi, T., Hashimoto, C. & Naito, T. (1991).** Photocyclization of enamides. XXXIII. Total syntheses of (±)-agroclavines, (±)-fumigaclavine B, and (±)-lysergene. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 23-30.
- O'Brien, M., Nielsen, K. F., O'Kiely, P., Forristal, P. D., Fuller, H. T. & Frisvad, J. C. (2006).** Mycotoxins and other secondary metabolites produced *in vitro* by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9268-9276.
- O'Gorman, C. M., Fuller, H. T. & Dyer, P. S. (2009).** Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **457**, 471-474.
- Ohmomo, S., Kaneko, M. & Atthasampunna, P. (1989).** Production of fumigaclavine B by a thermophilic strain of *Aspergillus fumigatus*. *MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechn.* **5**, 5-13.
- Pertz, H. (1996).** Naturally occurring clavines: antagonism/partial agonism at 5-HT_{2A} receptors and antagonism at alpha 1-adrenoceptors in blood vessels. *Planta Med.* **62**, 387-392.
- Rigbers, O. & Li, S.-M. (2008).** Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: overproduction and biochemical characterisation of a 4-dimethylallyltryptophan N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **283**, 26859-26868.
- Robertson, C. E., Black, D. F. & Swanson, J. W. (2010).** Management of migraine headache in the emergency department. *Semin. Neurol.* **30**, 201-211.
- Robinson, S. L. & Panaccione, D. G. (2012).** Chemotypic and genotypic diversity in the ergot alkaloid pathway of *Aspergillus fumigatus*. *Mycologia* **in press**, doi:10.3852/11-310.
- Roth, L., Frank, H. & Kormann, K. (2001).** Giftpilze, Pilzgifte. *Nikol Verlag*.
- Rubtsov, A. M. & Lopina, O. D. (2000).** Ankyrins. *FEBS Lett.* **482**, 1-5.
- Rundberget, T., Skaar, I. & Flåøyen, A. (2004).** The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. *Int. J. Food Microbiol.* **90**, 181-188.
- Sanger, F. & Coulson, A. R. (1975).** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**, 441-448.
- Schardl, C. L., Panaccione, D. G. & Tudzynski, P. (2006).** Ergot alkaloids--biology and molecular biology. *The Alkaloids, Chem. Biol.* **63**, 45-86.
- Schiff, P. L. (2006).** Ergot and its alkaloids. *Am. J. Pharma. Edu.* **70**, 1-10.
- Schmersahl, P. (2010).** Mutterkorn: Halluzinogen und Auslöser von Vergiftungen. *Deutsche Apotheker Zeitung* **29**, 48-52.
- Spilsbury, J. F. & Wilkinson, S. (1961).** Isolation of festuclavine and two new clavine alkaloids from *Aspergillus fumigatus*. *J. Chem. Soc.* 2085-2091.

- Stauffacher, D. & Tschertter, H. (1964).** Isomere des Chanoclavines aus *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL. (*Secale cornutum*). *Helv. Chim. Acta* **47**, 2186-2194.
- Steffan, N., Grundmann, A., Afiyatullo, A., Ruan, H. & Li, S.-M. (2009).** FtmOx1, a non heme Fe(II) and alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase, catalyses the endoperoxide formation of verruculogen in *Aspergillus fumigatus*. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 4082-4087.
- Stoll, A. (1918).** *Swiss Patent No. 79879* **79**, 879.
- Stoll, A. & Hofmann, A. (1943).** Die Alkaloide der Ergotoxingruppe: Ergocristin, Ergokryptin und Ergocornin. (7. Mitteilung über Mutterkornalkaloide). *Helv. Chim. Acta* **26**, 1570-1601.
- Stütz, P., Brunner, R. & Stadler, P. A. (1973).** Ein neues Alkaloid aus dem Mycel eines *Claviceps purpurea*-Stammes. Zur Biogenese von Ergocristin. *Experientia* **29**, 936-937.
- Sugui, J. A., Pardo, J., Chang, Y. C., Zarembek, K. A. et al. (2007).** Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus*: *gliP* deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone. *Eukaryot. Cell* **6**, 1562-1569.
- Sutton, P., Waring, P. & Mullbacher, A. (1996).** Exacerbation of invasive aspergillosis by the immunosuppressive fungal metabolite, gliotoxin. *Immunol. Cell Biol.* **74**, 318-322.
- Tekaia, F. & Latgé, J.-P. (2005).** *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 385-392.
- Tsai, H. F., Chang, Y. C., Washburn, R. G., Wheeler, M. H. & Kwon-Chung, K. J. (1998).** The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *J. Bacteriol.* **180**, 3031-3038.
- Tsai, H. F., Wang, H., Gebler, J. C., Poulter, C. D. & Schardl, C. L. (1995).** The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 119-125.
- Tudzynski, P., Holter, K., Correia, T., Arntz, C., Grammel, N. & Keller, U. (1999).** Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 133-141.
- Tulasne, L. R. (1853).** Memoire sur l'ergot des glumacees. *Ann. Sci. Nat. Botan. Biol. Vegetale* **20**, 5-56.
- Uhlig, S. & Petersen, D. (2008).** Lactam ergot alkaloids (ergopeptams) as predominant alkaloids in sclerotia of *Claviceps purpurea* from Norwegian wild grasses. *Toxicon* **52**, 175-185.
- Unsöld, I. A. (2006).** Molecular biological and biochemical investigations on the biosynthesis of fumigaclavines in *Aspergillus fumigatus* AF293 / B5233 and *Penicillium commune* NRRL2033. *Dissertation Universität Tübingen*.
- Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2005).** Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **151**, 1499-1505.

- Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2006).** Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: gene expression, purification and characterization of fumigaclavine C synthase FgaPT1. *Chembiochem* **7**, 158-164.
- Vinokurova, N. G., Ozerskaya, S. M., Baskunov, B. P. & Arinbasarov, M. U. (2003).** The *Penicillium commune* Thom and *Penicillium clavigerum* demelius fungi producing fumigaclavines A and B. *Microbiology (Moscow)* **72**, 149-151.
- Wagener, R. E., Davis, N. D. & Diener, U. L. (1980).** Penitrem A and roquefortine production by *Penicillium commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 882-887.
- Wallwey, C. & Li, S.-M. (2011).** Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 496-510.
- Wallwey, C., Matuschek, M. & Li, S.-M. (2010a).** Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: conversion of chanoclavine-I to chanoclavine-I aldehyde catalyzed by a short-chain alcohol dehydrogenase FgaDH. *Arch. Microbiol.* **192**, 127-134.
- Wallwey, C., Matuschek, M., Xie, X.-L. & Li, S.-M. (2010b).** Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Conversion of chanoclavine-I aldehyde to festuclavine by the festuclavine synthase FgaFS in the presence of the old yellow enzyme FgaOx3. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 3500-3508.
- Webster, J. & Weber, R. W. S. (2007).** Introduction to fungi. *Cambridge University Press Auflage: 3*.
- Willger, S. D., Grahl, N. & Cramer, R. A., Jr. (2009).** *Aspergillus fumigatus* metabolism: clues to mechanisms of *in vivo* fungal growth and virulence. *Med. Mycol.* **47 Suppl 1**, S72-S79.
- Williams, R. M., Stocking, E. M. & Sanz-Cervera, J. F. (2000).** Biosynthesis of prenylated alkaloids derived from tryptophan. *Topics Curr. Chem.* **209**, 97-173.
- Wilson, D. M., Mubatanhema, W. & Jurjevic, Z. (2002).** Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. *Adv. Exp. Med. Biol.* **504**, 3-17.
- Wülfing, C., Lombardero, J. & Plückthun, A. (1994).** An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. *J. Biol. Chem.* **269**, 2895-2901.
- Xie, X., Wallwey, C., Matuschek, M., Steinbach, K. & Li, S. M. (2011).** Formyl migration product of chanoclavine-I aldehyde in the presence of the old yellow enzyme FgaOx3 from *Aspergillus fumigatus*: a NMR structure elucidation. *Magn Reson. Chem.* **49**, 678-681.
- Yamazaki, M., Suzuki, S. & Miyaki, K. (1971).** Tremorgenic toxins from *Aspergillus fumigatus*. *Chem. Pharm. Bull.* **19**, 1739-1740.
- Zhao, Y., Liu, J., Wang, J., Wang, L., Yin, H., Tan, R. & Xu, Q. (2004).** Fumigaclavine C improves concanavalin A-induced liver injury in mice mainly *via* inhibiting TNF-alpha production and lymphocyte adhesion to extracellular matrices. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**, 775-782.

	180	190	200	210	220	230
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	DLK	DGRFALKTYI	YPALKAVVTG	GKTIHEL	VFGSVRR	LAVREPRILPPLNMLEEYIRSR
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	DLK	DGRFALKTYI	YPALKAVVTG	GKTIHEL	VFGSVRR	LAVREPRILPPLNMLEEYIRSR
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	DLK	DGRFALKTYI	YPALKAVVTG	GKTIHEL	VFGSVRR	LAVREPRILPPLNMLEEYIRSR
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	DLK	DGRFALKTYI	YPALKAVVTG	GKTIHEL	VFGSVRR	LAVREPRILPPLNMLEEYIRSR
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	DLK	GGKFELKVYI	YPALKSLATG	KSVQELM	FDSVHRL	CHQYPTLLTSLRLEEYVHAR
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	DLK	GGNFVLKTYI	YPALKALATG	KSIKTL	MFDSVYRL	CRQNPSLEAPLRLEEYVDSK
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	DLK	GGNFVLKTYI	YPALKALATG	KSIKTL	MFDSVYRL	CRQNPSLEAPLRLEEYVDSK
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	DLK	GGNFVLKTYI	YPALKALATG	KSIKTL	MFDSVYRL	CRQNPSLEAPLRLEEYVDSK
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	DLK	GGNFVLKTYI	YPALKALATG	KSIKTL	MFDSVYRL	CRQNPSLEAPLRLEEYVDSK
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	DLK	GGNFVLKTYI	YPALKALATG	KSIKTL	MFDSVYRL	CRQNPSLEAPLRLEEYVDSK
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	DLK	GDRFALKVYI	YPALKSIATG	VSSHDL	IFNSVRKL	SQKHTSIQPSFNVLCDDYVARRND
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	DLK	GKHFSALKAY	FYPBLKSVAT	STSTHDL	IFGSVYRL	SMTHAGIRPALALLDDYVTSR
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	DLK	ESQFALKVYI	FYPBLKSIATG	KSTHDL	IFDSVFKL	SQKHD SIQPAFQVLCDDYVSR
<i>Claviceps purpurea</i> P1	DLK	ESQFALKVYI	FYPBLKSIATG	KSTHDL	IFDSVFKL	SQKHD SIQPAFQVLCDDYVSR
<i>Epichloë festucae</i> E2368	DLK	GDKFVLKTYI	YPBLKSVAT	GKSVQEL	VFGSVRKL	LAQKHK SIRPAFEMLEDYVQSR
<i>Epichloë festucae</i> F11	DLK	GDKFVLKTYI	YPBLKSVAT	GKSVQEL	VFGSVRKL	LAQKHK SIRPAFEMLEDYVQSR
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	DLK	GDKFVLKTYI	YPBLKSVAT	GKSVQEL	VFGSVRKL	LAQKHK SIRPAFEMLEDYVQSR
<i>Epichloë typhina</i> E5819	DLK	GDKFVLKTYI	YPBLKSVAT	GKSVQEL	VFGSVRKL	LAQKHK SIRPAFEMLEDYVQSR
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	DLK	GNQFALKVYI	YPALKSLATG	KSMHEL	IFGSVHKL	SLQYRSIRAAFERLEGFVISR
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	DLK	GNQFALKVYI	YPALKSLATG	KSMHEL	IFGSVHKL	SLQYRSIRAAFERLEGFVISR
<i>Periglandula ipomoeae</i> IasaF13	DLK	GNQFALKVYI	YPALKSLATG	KSIHEL	IFGSVRKL	SLQYRSIRAAFERLEGFVISR

	240	250	260	270	280		
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163GSKST	ASPR	RLVSCDLTS	PAKSRTKIY	LEQMVSL	EAM	EDLWTLGGRRRD
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10GSKST	ASPR	RLVSCDLTS	PAKSRTKIY	LEQMVSL	EAM	EDLWTLGGRRRD
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210GSKST	ASPR	RLVSCDLTS	PAKSRTKIY	LEQMVSL	EAM	EDLWTLGGRRRD
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293GSKST	ASPR	RLVSCDLTS	PAKSRTKIY	LEQMVSL	EAM	EDLWTLGGRRRD
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033GTSS	TAASPR	RLISCDLCD	PRKSRTKIY	LELMNVSL	EAM	ENLWTMGGRSD
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371GPNST	TAASPR	RLISCDLID	PSKSRVKIY	ILELNVTL	EAM	EDLWTMGRLND
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480GPNST	TAASPR	RLISCDLID	PSKSRVKIY	ILELNVTL	EAM	EDLWTMGRLND
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97GPNST	SSASPR	RLISCDLID	PSKSRVKIY	ILELNVTL	EAM	EDLWTMGRLND
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818GPNST	SSASPR	RLISCDLID	PSKSRVKIY	ILELNVTL	EAM	EDLWTMGRLND
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517GPNST	ASPR	RLISCDLID	PSKSRVKIY	ILELNVTL	EAM	EDLWTMGRLND
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	PDSNA	AEAEAGVPASAL	RARLLSCDLVD	PSKSRTKIY	LEQTVSL	TAM	EDLWTLGGRRTD
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	..KL	STEAGDGARG..A	LEARLLSCDLVQ	PAASRVKIY	LEKTVSL	SAM	EDLWTLGGRRTD
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	..NH	SAESD...QHIAL	HARLLSCDLID	PAKSRVKIY	LEKTVSL	SAM	EDLWTLGGRRVD
<i>Claviceps purpurea</i> P1	..NH	SAEVD...QHGA	LHARLLSCDLID	PAKSRVKIY	LEKTVSL	SAM	EDLWTLGGRRVD
<i>Epichloë festucae</i> E2368	..NK	VPTTDDS..HNT	PLSSRLLSCDLVS	PTKSRVKIY	LLERMVSL	PAM	EDLWTLGGRRED
<i>Epichloë festucae</i> F11	..NK	VPTTDDS..HNT	PLSSRLLSCDLVS	PTKSRVKIY	LLERMVSL	PAM	EDLWTLGGRRED
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	..NE	VSTTDGS..HKT	PLSSRLLSCDLIS	PTKSRVKIY	LLERMVSL	PAM	EDLWTLGGRRED
<i>Epichloë typhina</i> E5819	..NK	VSTTDDS..HNT	PLSSRLLSCDLVS	PTKSRVKIY	LLERMVSL	PAM	EDLWTLGGRRED
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	..NS	RGRGTG...EGGV	LHERLLSCDLVN	SAKSRTKIY	LEQMVSL	SAV	EDLWTLGGQLTD
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	..NS	RAQTG...DCGA	LHERLLSCDLVD	PAKSRTKIY	LEQMVSL	SAM	EDLWTLGGQLTD
<i>Periglandula ipomoeae</i> IasaF13	..NI	SAETGG...EYSA	LQPRLLSCDLIN	PAKSRVKIY	LEQMTVSL	SAM	EDLWTLGGRRTD

	290	300	310	320	330	340
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	ASTLE	EGLSLVRELWDLIQLSP	GLKSYPA	PYLP	PLGVIPDERLPL	MANFTLHQNDPVPEPQV
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	ASTLE	EGLSLVRELWDLIQLSP	GLKSYPA	PYLP	PLGVIPDERLPL	MANFTLHQNDPVPEPQV
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	ASTLE	EGLSLVRELWDLIQLSP	GLKSYPA	PYLP	PLGVIPDERLPL	MANFTLHQNDPVPEPQV
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	ASTLE	EGLSLVRELWDLIQLSP	GLKSYPA	PYLP	PLGVIPDERLPL	MANFTLHQNDPVPEPQV
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	APTLA	GLVMIRELWDLINLPS	GIISYPE	SYLKLGEV	PNQOLPL	MANYTLHHDDPMPEPQV
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	ASTLA	GLEMLRELWDLIKLFP	GMREYPE	PFLQ	LGTIPDEQLPL	MANYTLHHNQAMPEPQV
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	ASTLA	GLEMLRELWDLIKLFP	GMREYPE	PFLQ	LGTIPDEQLPL	MANYTLHHNQAMPEPQV
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	ASTLA	GLEMLRELWDLIKLFP	GMREYPE	PFLQ	LGTIPDEQLPL	MANYTLHHNQAMPEPQV
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	ASTLA	GLEMLRELWDLIKLFP	GMREYPE	PFLQ	LGTIPDEQLPL	MANYTLHHNQAMPEPQV
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	ASTLA	GLEMLRELWDLIKLFP	GMREYPE	PFLQ	LGTIPDEQLPL	MANYTLHHNQAMPEPQV
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	SSTLN	GLDMMRELWDLIQLSP	GMKYPE	SD	LKLGEVDEQLPS	MVHYALHPDQPMPEPQV
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	PSALE	GLGMVROLWDLIDVDF	VCEAYPQ	TYLRLGQV	DEQLPS	MANYTLHHDDPMPEPQV
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	ASTMD	GLDMLRELWSLKVPT	GHLEYPKGY	LELGEIPNEQLPS	MANYTLHHNNPMPEPQV	
<i>Claviceps purpurea</i> P1	ASTMD	GLDMLRELWSLKVPT	GHLEYPKGY	LELGEIPNEQLPS	MANYTLHHNNPMPEPQV	
<i>Epichloë festucae</i> E2368	QSTIE	GLEMIRELWGLLNMS	GLRAYPE	PYLP	LGAIPNEQLPS	MANYTLHHNDPIPEPQV
<i>Epichloë festucae</i> F11	QSTIE	GLEMIRELWGLLNMS	GLRAYPE	PYLP	LGAIPNEQLPS	MANYTLHHNDPIPEPQV
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	QSTIE	GLEMIRELWGLLNMS	GLRAYPE	PYLP	LGAIPNEQLPS	MANYTLHHNDPIPEPQV
<i>Epichloë typhina</i> E5819	QSTIE	GLEMIRELWGLLNMS	GLRAYPE	PYLP	LGAIPNEQLPS	MANYTLHHNDPIPEPQV
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	QSTMD	GLDLIRELWDLIRIP	GLRSYPE	PYLP	LGLKVPDEQLPS	MVNYTLHHDDPTPEPQV
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	QSTMD	GLDLIRELWDLIRIP	GLRSYPE	PYLP	LGLKVPDEQLPS	MVNYTLHHDDPTPEPQV
<i>Periglandula ipomoeae</i> IasaF13	PSTMD	GLDMVRELWNLLEMP	AGLQAYPKPY	LGLGKIPNEQLPS	MANYTLHHNDPMPEPQV	

Fortsetzung Abb. 6-1:

	350	360	370	380	390	400
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	YFTTFGMNDMA	VADALTTFFERR	GWSEMA	MARTYETTLKSY	YPHADH	DKLNYLHAYISFSYR
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	YFTTFGMNDMA	VADALTTFFERR	GWSEMA	MARTYETTLKSY	YPHADH	DKLNYLHAYISFSYR
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	YFTTFGMNDMA	VADALTTFFERR	GWSEMA	MARTYETTLKSY	YPHADH	DKLNYLHAYISFSYR
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	YFTTFGMNDMA	VADALTTFFERR	GWSEMA	MARTYETTLKSY	YPHADH	DKLNYLHAYISFSYR
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	YFTTFGMNDGR	VADGLATFFKRH	GYPDHLQKYKDS	LRAYYPHVD	HDNVNYLHAYISFSYR	
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	YFTTFGLNDGR	IADGLVTFERR	GWNHMAQTYKDS	LRAYYPHAD	QETLNYLHAYISFSYR	
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	YFTTFGLNDGR	VADGLVTFERR	GWSHMAQTYKDS	LRAYYPHAD	QETLNYLHAYISFSYR	
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	YFTTFGLNDGR	IADGLVTFERR	GWNHMAQTYKDS	LRAYYPHAD	QETLNYLHAYISFSYR	
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	YFTTFGLNDGR	IADGLVTFERR	GWNHMAQTYKDS	LWAYYPHAD	QETLNYLHAYISFSYR	
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	YFTTFGLNDGR	VADGLVTFERR	GWNHMAQTYKDS	LRAYYPHAD	QETLNYLHAYISFSYR	
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	YFTVFGMSDAG	ITNALATFFSRH	GWYEMAKKYRVFL	EGSFPHND	FESLNYLHTYVSFSYR	
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	YFNVFGMSDHK	ISSALASFFENH	GWHDMAAKYRSFL	RDS.PNHDL	ESLNYLHTYVSFSYR	
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	YFTVFGMNDAE	ISNALTIFFQRH	GDDMAKKYRVFL	QDSYYPYHDF	FESLNYLHAYISFSYR	
<i>Claviceps purpurea</i> P1	YFTVFGMNDAE	ISNALTIFFQRH	GDDMAKKYRVFL	QDSYYPYHDF	FESLNYLHAYISFSYR	
<i>Epichloë festucae</i> E2368	YFTVFGMNDME	VTNALTKFFMRH	EWSDMASKYKACL	RESFPHHNY	EALNYIHSYISFSYR	
<i>Epichloë festucae</i> F11	YFTVFGMNDME	VTNALTKFFMRH	EWSDMASKYKACL	RESFPHHNY	EALNYIHSYISFSYR	
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	YFTVFGMNDME	VTNALTKFFMRH	EWSDMASKYKACL	RESFPHD	NFEALNYIHSYISFSYR	
<i>Epichloë typhina</i> E5819	YFTVFGMNDME	VTNALTKFFMRH	EWSDMASKYKACL	RESFPHHNY	EALNYIHSYISFSYR	
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	YFTVFGMSDMD	VTNALTKFFERR	GWSEMARKYRAFL	QKSFPHDD	HESLNYIHTYISFSYR	
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	YFTVFGMSDLD	VTNALTKFFERR	GWSEMARKYRAFL	QKSFPHDD	HESLNYIHTYISFSYR	
<i>Penglandula ipomoeae</i> IasaF13	YFTVFGMSDFK	VTNALTKVFERR	GWNEMARKYRVFL	QESYFND	DLESLNYLHTYISFSYR	

	410	420	430	440	450
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	DRTPYLSVYLQ	SFETGDWA...	VANLSESKVKC...	QDAACQPTS	LPPDLSKGTGVYYS
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	DRTPYLSVYLQ	SFETGDWA...	VANLSESKVKC...	QDAACQPTS	LPPDLSKGTGVYYS
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	DRTPYLSVYLQ	SFETGDWA...	VANLSESKVKC...	QDAACQPTAL	LPPDLSKGTGVYYS
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	DRTPYLSVYLQ	SFETGDWA...	VANLSESKVKC...	QDAACQPTS	LPPDLSKGTGVYYS
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	KGSPYLSVYLQ	SFETGDWDP...	ICDELRL...	CPCLQAR	LQGHVSWPSYLF...
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	KGKPYLSVYLQ	TFETGDWDP...	ICKCAT...	VQMRNQ...	LWDSGGQASP...
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	KGTPYLSVYLQ	SFETGDWDP...	ISNFG...	IPVAKP...	LRSNISDPDR...
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	KGKPYLSVYLQ	TFETGDWDP...	ICKCAA...	VERRNQ...	LWDPGGQASP...
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	KGKPYLSVYLQ	TFETGDWDP...	ICKCAA...	VERRNQ...	LWDPGGQASP...
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	KGKPYLSVYLQ	TFETGDWDP...	ICKCAT...	VQMRNQ...	LWDSGGQASP...
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	KNKPYLSVYLH	SFETGOWPACEM	FVPTYRTQTS...	MRACEP	FTP...
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	RHKPYLSVYLH	TFESGRWP...	ILPNSPTAFA...	THRCE	LS...
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	RNKPYLSVYLH	TFETGRWP...	VVADSPISFD...	AYRRCD	LSTK...
<i>Claviceps purpurea</i> P1	RNKPYLSVYLH	TFETGRWP...	VVADSPISFD...	AYRRCE	LSTK...
<i>Epichloë festucae</i> E2368	NNKPYLSVYLH	SFETGEWP...	VC.KFPMIMT...	MQCAKGM	MGF...
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	NNKPYLSVYLH	SFETGEWP...	VC.KFPMIMT...	MQCAKGM	MGF...
<i>Epichloë typhina</i> E5819	NNKPYLSVYLH	SFETGEWP...	VC.KFPMIMT...	MQCAKGM	MGF...
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	NNKPYLSVYLH	SFESGNWP...	VLDPVPVAFD...	AFRRDP	SPYKKIQLGLD...
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	NNKPYLSVYLH	SFESGNWP...	PLACSARCSC...	SFRCPIS	S...
<i>Penglandula ipomoeae</i> IasaF13	SNKPYLSVYLH	TFESGHWDP...	IFPDSPATAFD...	AYRRCD	MASKKINLADY...

Fortsetzung Abb. 6-1:

	1	10	20	30	40	50
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	.MTISAPP	IIDIRQAGLE	SSIPD	QVVEGLT	KEVKTLPAL	LFYST
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	.MTISAPP	IIDIRQAGLE	SSIPD	QVVEGLT	KEVKTLPAL	LFYST
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	.MTISAPP	IIDIRQAGLE	SSIPD	QVVEGLT	KEVKTLPAL	LFYST
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	.MTISAPP	IIDIRQAGLE	SSIPD	QVVEGLT	KEVKTLPAL	LFYST
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	.MTIDSL	ILDIRSSTFE	SSIPD	QVTAGLS	TTPKTLPAL	LFYST
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	MGSINPPQ	ILDIRRSKFE	SSIPK	QVEAGLL	SSPKTLPAL	LFYST
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	MGNINPPQ	ILDIRRSKFE	SSIPK	QVEAGLL	SSPKTLPAL	LFYST
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	MGNTNPPH	ILDIRRSKFE	SSIPK	QVEAGLL	SSPKTLPAL	LFYST
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	MGSINPPQ	ILDIRRSKFE	SSIPK	QVEAGLL	SSPKTLPAL	LFYST
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	MGSINPPQ	ILDIRRSKFE	SSIPK	QVEAGLL	SSPKTLPAL	LFYST
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	MGSINPPQ	ILDIRRSKFE	SSIPK	QVEAGLL	SSPKTLPAL	LFYST
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	MGSINPPQ	ILDIRRSKFE	SSIPK	QVEAGLL	SSPKTLPAL	LFYST
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	..MPACS	VTDIRSHV	EDSLPD	QVIKGLK	SSPKTLPAL	LFYST
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	..MKKTAS	VTDIRSSRA	EDSLPD	QVIKGLK	SSPKTLPAL	LFYST
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	..MPALP	VIDIRSNH	VEDSLPE	QIIKGLT	SQPKTLP	LFYST
<i>Claviceps purpurea</i> P1	..MPALP	VIDIRSNH	VEDSLPE	QIIKGLT	SQPKTLP	LFYST
<i>Epichloë festucae</i> E2368	..MSKPN	VLDIRLATE	EDSIVD	LVIINGLR	KQPKTLPAL	LFYST
<i>Epichloë festucae</i> F11	..MSKPN	VLDIRLATE	EDSIVD	LVIINGLR	KQPKTLPAL	LFYST
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	..MSKPN	VLDIRLATE	EDSIVD	LVIINGLR	KQPKTLPAL	LFYST
<i>Epichloë typhina</i> E5819	..MSKPN	VLDIRLATE	EDSIVD	LVIINGLR	KQPKTLPAL	LFYST
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	..MAAPR	VIDIRSHH	VEDSLTD	QVLKGF	INGPKTLP	AQLFYT
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	..MASPR	VIDIRSHH	VEDSLTD	QVLKGF	INGPKTLP	AQLFYT
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	..MAAPS	VIDIRSH	VEDSLPD	QVVKGL	GSDPK	KTLPAL

	60	70	80	90	100	110
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	PRHEELC	ILKAEASK	MAASTA	QDLSVID	MGSA	MDKVIL
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	PRHEELC	ILKAEASK	MAASTA	QDLSVID	MGSA	MDKVIL
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	PRHEELC	ILKAEASK	MAASTA	QDLSVID	MGSA	MDKVIL
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	PRHEELC	ILKAEASK	MAASTA	QDLSVID	MGSA	MDKVIL
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	PRHEELR	ILRARA	AEAVAS	IANN	SVVVDL	GSASLD
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	PRHEEIQ	ILKDKATD	MAASTA	IADG	SVVVDL	GSASLD
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	PRHEEIQ	ILKKEA	ADTAAS	IADG	SVVVDL	GSASLD
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	PRHEEIQ	ILKKEA	ADTAAS	IADG	SVVVDL	GSASLD
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	PRHEEIQ	ILKDKATD	MAASTA	IADG	SVVVDL	GSASLD
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	PRHEEIQ	ILKDKATD	MAASTA	IADG	SVVVDL	GSASLD
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	PRHEEIQ	ILKDKATD	MAASTA	IADG	SVVVDL	GSASLD
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	PRHEEIQ	ILKDKATD	MAASTA	IADG	SVVVDL	GSASLD
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	PRHQEVD	ILKQRGDE	MARAT	APNS	VILDL	GSANLE
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	PRRQEID	ILKQRGDE	MAGS	IAAN	SVVVDL	GSANLE
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	PRRQEIE	ILKQGGND	TARS	IAPS	SVILDL	GSANLE
<i>Claviceps purpurea</i> P1	PRRQEIE	ILKQGGND	TARS	IAPS	SVILDL	GSANLE
<i>Epichloë festucae</i> E2368	PRHQEVQ	ILKKKAQE	MAAS	IPMN	SVVVDL	GSASLD
<i>Epichloë festucae</i> F11	PRHQEVQ	ILKKKAQE	MAAS	IPMN	SVVVDL	GSASLD
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	PRHQEVQ	ILKKKKSQ	MAAS	IPMN	SVVVDL	GSASLD
<i>Epichloë typhina</i> E5819	PRHQEVQ	ILKKKKAQE	MAAS	IPMN	SVVVDL	GSASLD
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	PRQQEIQ	ILKRGDD	MARS	IAEN	SVILDL	GSANLE
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	PRQQEIK	ILKQRGDD	MARS	IAEN	SVILDL	GSANLE
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	PRHQEIE	ILKQRGDE	TARS	IAEN	SVILDL	GSANLE

	120	130	140	150	160	170
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	SELASNFQ	.AIPVDR	FHYVRF	AAALH	GTDFDGL	HLQNA
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	SELASNFQ	.AIPVDR	FHYVRF	AAALH	GTDFDGL	HLQNA
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	SELASNFQ	.AIPVDR	FHYVRF	AAALH	GTDFDGL	HLQNA
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	SELASNFQ	.AIPVDR	FHYVRF	AAALH	GTDFDGL	HLQNA
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	SELQSTMK	.SLPYKQ	FERV	KIGAL	HGTFD	DGVO
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	SELTSTLQ	.AIPTDQ	FVHVQ	FSA	LHGTFD	DGLQ
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	SELTSTLQ	.AIPTDQ	FVHVQ	FSA	LHGTFD	DGLQ
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	SELTSTLQ	.AIPTEQ	FVHVQ	FSA	LHGTFD	DGLQ
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	SELNSTLK	.AIPTDQ	FVHVQ	FSA	LHGTFD	DGLQ
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	SELNSTLK	.TIPTDQ	FVHVQ	FSA	LHGTFD	DGLQ
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	SELNSTLK	.AIPTDQ	FVHVQ	FSA	LHGTFD	DGLQ
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	SELTSTLQ	.AIPTDQ	FVHVQ	FSA	LHGTFD	DGLQ
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	PQLEVTLN	.EIPTSE	FRHV	RFAGL	HGTFD	DGLR
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	PQLTSTLE	.AMIATR	FRHV	VGLG	LHGTFD	DGLR
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	PQLATTLK	.EIPSSN	FRHV	RFAGL	HGTFD	DGLR
<i>Claviceps purpurea</i> P1	PQLATTLK	.EIPSSN	FRHV	RFAGL	HGTFD	DGLR
<i>Epichloë festucae</i> E2368	SQLESTLA	.AIPTON	FRHV	RFAGL	HGTFD	DGLH
<i>Epichloë festucae</i> F11	SQLESTLA	.AIPTON	FRHV	RFAGL	HGTFD	DGLH
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	SQLESTLA	.AIPTON	FRHV	RFAGL	HGTFD	DGLH
<i>Epichloë typhina</i> E5819	SQLESTLA	.AIPTON	FRHV	RFAGL	HGTFD	DGLH
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	SQLASTLN	.SIPTNK	FRHV	RFTG	LHGTFD	DGLR
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	SQLASTLD	.SIPTDK	FRHV	RFTG	LHGTFD	DGLR
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	PQLMSTLK	.AIPTEK	FRHV	RFAGL	HGTFD	DGLR

Abb. 6-2: Multi-Proteinsequenzvergleiche von 23 orthologen N-Methyltransferase-Genen.

	180	190	200	210	220	230
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	DNAASFLRN	IAQSALST	SPTQSSI	IVSLDSCKLP	TKILRAYTAD	GVVPFALASLSYANS
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	DNAASFLRN	IAQSALST	SPTQSSI	IVSLDSCKLP	TKILRAYTAD	GVVPFALASLSYANS
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	DNAASFLRN	IAQSALST	SPTQSSI	IVSLDSCKLP	TKILRAYTAD	GVVPFALASLSYANS
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	DNAASFLRN	IAQSALST	SPTQSSI	IVSLDSCKLP	TKILRAYTAD	GVVPFALASLSYANS
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	LNAASFLRS	IAKSALTA	SPAESS	IFLSLDSCKVP	TKVLRAYTAE	GVVPFALASLDYGN
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	SNAAKFLHN	IASHALVE	SPSQSSI	ILLTLDSCKVP	TKVTRAYTAE	GVVPFALES
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	PNAAEFLRN	IASHALVE	SSSQSSI	ILLTLDSCKVP	TKVIRAYTAE	GVVPFALES
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	PNAAEFLRN	IASOALTE	SPSQSSI	ILLTLDSCKVP	TKVTRAYTAE	GVVPFALES
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	PNAAKFLHN	IASYALVE	SPSHSSI	ILLTLDSCKVP	TKVIRAYTAE	GVVPFALES
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	PNAAKFLHN	IASHALVE	SPSQSSI	ILLTLDSCKVP	TKVIRAYTAE	GVVPFALES
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	PNAAKFLHN	IASYALVE	SPSHSSI	ILLTLDSCKVP	TKVIRAYTAE	GVVPFALES
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	PNAAKFLHN	IASHALVE	SPSQSSI	ILLTLDSCKVP	TKVIRAYTAE	GVVPFALES
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	ASAATFLGN	IASOALRGA	SKDQSSI	ILMSLDSCKVP	TQILRAYTSE	GVVPFALQSLTYAK
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	RNAAAFRLS	IANHALTGA	AAESS	ILVSLDSCKMPT	QILRAYTSE	GVVPFALQSLTYAK
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	QNAAAFLQN	IANHALTGA	SKNKSSI	ILLSLDSCKVP	TKVTRAYTSD	GVVPFALQSLTYAK
<i>Claviceps purpurea</i> P1	QNAAAFLQN	IANHALTGA	SKNKSSI	ILLSLDSCKVP	TKVTRAYTSD	GVVPFALQSLTYAK
<i>Epichloë festucae</i> E2368	PNAAAFLLSN	IGQHAFGKG	SGDQCSI	ILMSLDSCKVP	TQVLRAYTCE	GVVPFALQSLTYANG
<i>Epichloë festucae</i> F11	PNAAAFLLSN	IGQHAFGKG	SGDQCSI	ILMSLDSCKVP	TQVLRAYTCE	GVVPFALQSLTYANG
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	PNAAAFLLSN	IGQHAFGKG	SGDQCSI	ILMSLDSCKVP	TQVLRAYTCE	GVVPFALQSLTYANG
<i>Epichloë typhina</i> E5819	PNAAAFLLSN	IGQHAFGKG	SGDQCSI	ILMSLDSCKVP	TQVLRAYTCE	GVVPFALQSLTYANG
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	QNAATFLHN	IAKANALGQ	GKSRQA	ILMSLDSCKVP	TQVLRAYTSD	GVVPFALQSLTYAK
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	QNAATFLHN	IAKANALGQ	GKSRQA	ILMSLDSCKVP	TQVLRAYTSD	GVVPFALQSLTYAK
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	PNAATFLRN	IASOALRGA	SKDQSSI	IFLSLDSCKVP	TQILRAYTSE	GVVPFALQSLTYAK

	240	250	260	270	280
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	LFHPKGD	RK	IFNEEDWYFHS	SEWNHALGRHEAS	LITQSKDIQLGAPLETVIVR
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	LFHPKGD	RK	IFNEEDWYFHS	SEWNHALGRHEAS	LITQSKDIQLGAPLETVIVR
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	LFHPKGD	RK	IFNEEDWYFHS	SEWNHALGRHEAS	LITQSKDIQLGAPLETVIVR
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	LFHPKGD	RK	IFNEEDWYFHS	SEWNHALGRHEAS	LITQSKDIQLGAPLETVIVR
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	LFARGKG	ENQ	VFQPSDWHF	FLSEWNVYMLGRHEAS	LITKGEVRLGSPLDIVIG
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	LFQDDG	GEN	VFDPEDWYF	FLSEWNVYVLRHEAS	LITPRSKDIKLGRLPLDKIVVG
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	LFQDDG	GEN	VFDPEDWYF	FLSEWNVYVLRHEAS	LITPRSKDIKLGQPLDNIVVS
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	LFQDDG	EEER	VFDPDHDWHF	FLSEWNVYILGRHEAS	LITPQRSDIKLGSPLDRIIVVA
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	LFHQDV	GEN	VFDPEDWYF	FLSEWNVYVLRHEAS	LITPRSKDIKLGRLPLDKIVVG
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	LFHQDV	GEN	VFDPEDWYF	FLSEWNVYVLRHEAS	LITPRSKDIKLGRLPLDKIVVG
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	LFHQDV	GEN	VFDPEDWYF	FLSEWNVYVLRHEAS	LITPRSKDIKLGRLPLDKIVVG
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	LFQDDG	EN	VFDPEDWYF	FLSEWNVYVLRHEAS	LITPRSKDIKLGRLPLDKIVVG
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	LLRGPML	HNDSD	ELPCYLQ	PDDEWYHSEWNFV	LGRHEASLITPRYRDVHGLSLQDITVK
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	LLRGRDD	DDDDA	ALLSRHLN	PDDEWYHSEWNFV	LGRHEASLITPRSRDLVGLPLLDNVTVQ
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	LLCDRID	NGIDEK	VLSCNLR	PEHWHYLS	SEWNFALGRHEASLITPRFGDVCLGSMQLQDIVVK
<i>Claviceps purpurea</i> P1	LLCDRID	NGIDEK	VLSCNLR	PEHWHYLS	SEWNFALGRHEASLITPRFGDVCLGSMQLQDIVVK
<i>Epichloë festucae</i> E2368	LFSEKN	KTQAS	GDVQHKVFN	LPDEWYLS	SEWNFVLRHEASLITPRSKDIKLLPPLDGLIVS
<i>Epichloë festucae</i> F11	LFSEKN	KTQAS	GDVQHKVFN	LPDEWYLS	SEWNFVLRHEASLITPRSKDIKLLPPLDGLIVS
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	LFSEKN	KTQAS	GDVQHKVFN	LPDEWYLS	SEWNFVLRHEASLITPRSKDIKLLPAPLDGLIVG
<i>Epichloë typhina</i> E5819	LFSEKN	KTQAS	GDVQHKVFN	LPDEWYLS	SEWNFVLRHEASLITPRSKDIKLLPPLDGLIVS
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	LFQGGK	SKNGV	NGRQSSCN	LDPEWYLS	QWNFALGRHEASLITPRSKDIKLGPLLDNIVVR
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	LFQGGK	TKNGV	NGRQSSCN	LDPEWYLS	QWNFALGRHEASLITPRSKDIKLGPLLDNIVVR
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	LFCEOT	QND	FNKEPSSCH	LNPD	DDWYHSEWNFVLRHEASLITPRNLNDHGLPLLDHIVR

	290	300	310	320	330	
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	RDEKIRFG	CSYKYDKAERD	QLFHSAGLEDA	AVWTA	PD	CDVAFYQLRLRLN
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	RDEKIRFG	CSYKYDKAERD	QLFHSAGLEDA	AVWTA	PD	CDVAFYQLRLRLN
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	RDEKIRFG	CSYKYDKAERD	QLFHSAGLEDA	AVWTA	PD	CDVAFYQLRLRLN
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	RDEKIRFG	CSYKYDKAERD	QLFHSAGLEDA	AVWTA	PD	CDVAFYQLRLRLN
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	KHEKVRFG	CSYKYDPERQ	ELFGSAGLTDV	KE	WSEV	EGCDVTFYQLQMSH
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	KHEKVRFG	CSYKYDSEERK	ELFGTAGLRD	VK	SW	SKEGCDVAFYQLKCCPN
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	KHEKVRFG	CSYKYDSEERK	ELFGTAGLRD	VK	SW	SKEGCDVAFYQLKCCPN
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	KHEKIRFG	CSYKYDCGERK	ELFESAGLHD	VK	IWSK	EGCDVAFYQLKCCPN
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	KHEKVRFG	CSYKYDSGERK	ELFETAGLRD	VK	SW	SKEGCDVAFYQLKCCPN
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	KHEKVRFG	CSYKYDSEERK	ELFETAGLRD	VK	SW	SKEGCDVAFYQLKCCPN
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	KHEKVRFG	CSYKYDSGERK	ELFETAGLRD	VK	SW	SKEGCDVAFYQLKCCPN
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	KHEKVRFG	CSYKYDSEERK	ELFETAGLRD	VK	SW	SKEGCDVAFYQLKCCPN
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	KDEKIRFG	CSYKYDMEERK	QLFLDAGVEQ	DVAW	TNEG	CDVIVELKKSRSNTEKLGIDRN
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	RDEKVRFG	CSYKYDSEERE	TFLSDAGLRCE	AVW	TNQ	GCHVAIFYQLKLAASL
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	KHEKVRFA	CSYKYDAKERQ	KFLD	SGVD	QGMV	TNEGCDVAIFYELKLA
<i>Claviceps purpurea</i> P1	KDEKVRFA	CSYKYDAKERQ	KFLD	SGVD	QGMV	TNEGCDVAIFYELKLA
<i>Epichloë festucae</i> E2368	KDEKVRFG	CSYKYDQEEER	MELFAAGVKNEV	TW	SD	EGCDVAFYQLKLS
<i>Epichloë festucae</i> F11	KDEKVRFG	CSYKYDQEEER	MELFAAGVKNEV	TW	SD	EGCDVAFYQLKLS
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	KDEKVRFG	CSYKYDQEEER	MELFAAGVKNEV	TW	SD	EGCDVAFYELKLS
<i>Epichloë typhina</i> E5819	KDEKVRFG	CSYKYDQEEER	MELFAAGVKNEV	TW	SD	EGCDVAFYQLKLS
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	KDEKVRFG	CSYKYDA	SEERLEFAAGL	KDGT	AWTSEK	CDVAIFYDLKLS
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	KDEQVRFG	CSYKYDAL	ERLEFLFAAGL	KD	ETAWTGEK	CDVAIFYDLKLS
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	KDEKVRFG	CSYKYDDL	ERDKFLD	AGVKDEMAW	TNEG	CDIAIFYELKMS

Fortsetzung Abb. 6-2:

Start von *easE* aus *C. purpurea* P1 nach der NCBI-Datenbank

	130										140										150										160										170																					
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	W	V	W	E	V	G	R	T	E	D	E	T	C	H	A	H	S	P	R	G	A	P	C	H	O	G	R	I	P	L	Y	S	A	A	V	E	S	V	D	Q	I	Q	V	A	V	R	F	A	Q	R	H	R	L	R	L			
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	W	V	W	E	V	G	R	T	E	D	E	T	C	H	A	H	S	P	R	G	A	P	C	H	O	G	R	I	P	L	Y	S	A	A	V	E	S	V	D	Q	I	Q	V	A	V	R	F	A	Q	R	H	R	L	R	L			
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	W	V	W	E	V	G	R	T	E	D	E	T	C	H	A	H	S	P	R	G	A	P	C	H	O	G	R	I	P	L	Y	S	A	A	V	E	S	V	D	Q	I	Q	V	A	V	R	F	A	Q	R	H	R	L	R	L			
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	W	V	W	E	V	G	R	T	E	D	E	T	C	H	A	H	S	P	R	G	A	P	C	H	O	G	R	I	P	L	Y	S	A	A	V	E	S	V	D	Q	I	Q	V	A	V	R	F	A	Q	R	H	R	L	R	L			
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	W	V	W	E	A	G	E	S	A	D	A	C	P	.	L	G	S	Q	M	K	I	R	.	.	T	Q	C	H	O	G	R	I	P	F	Y	S	A	M	V	S	S	A	K	H	V	Q	A	I	M	F	A	K	H	N	R	L	R	L				
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	W	V	W	E	A	G	E	T	A	N	E	S	C	P	.	V	G	L	S	L	R	T	A	S	A	V	N	S	C	H	O	G	R	I	P	L	F	T	V	G	V	E	S	T	K	Q	V	E	A	V	R	F	A	R	K	H	N	R	L	R		
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	W	V	W	E	A	G	E	T	A	N	E	T	C	P	.	V	G	L	S	L	R	T	V	S	A	V	N	S	C	H	O	G	R	I	P	L	Y	S	V	G	V	E	S	A	Q	Q	V	Q	A	V	R	F	A	R	R	H	N	R	L	R		
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	W	V	W	E	A	G	E	S	A	N	E	T	C	P	.	M	G	S	L	Q	T	A	T	A	A	K	S	C	H	O	G	R	I	P	L	Y	S	A	T	V	E	S	A	Q	Q	V	Q	A	V	R	F	A	R	R	H	N	R	L	R			
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	W	V	W	E	A	G	E	T	A	N	E	S	C	P	.	V	G	L	S	L	R	T	A	S	A	V	N	S	C	H	O	G	R	I	P	H	F	T	V	G	V	E	S	T	K	Q	V	E	A	V	R	F	A	R	R	Y	N	R	L	R		
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	W	V	W	E	A	G	E	T	A	N	E	S	C	P	.	V	G	L	S	L	R	T	A	S	A	V	N	S	C	H	O	G	R	I	P	L	F	T	V	G	V	E	S	T	K	Q	V	E	A	V	R	F	A	R	K	H	N	R	L	R		
<i>Trichophyton verrucosum</i> HK10517	W	V	W	E	A	G	E	T	A	N	E	S	C	P	.	V	G	L	S	L	R	T	A	S	A	V	N	S	C	H	O	G	R	I	P	L	F	T	V	G	V	E	S	T	K	Q	V	E	A	V	R	F	A	R	K	H	K	R	L	R		
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	W	V	W	E	T	G	N	T	A	Q	E	S	C	F	D	T	W	P	G	Y	H	H	R	T	S	D	C	H	O	G	R	I	P	L	Y	S	A	I	V	E	S	T	S	D	I	Q	S	C	V	K	F	A	N	H	N	R	L	R				
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	W	V	W	E	S	G	N	T	P	E	D	S	C	.	L	H	V	T	P	S	.	.	A	L	P	Q	S	A	C	G	Q	G	R	I	P	L	Y	S	A	M	V	K	S	A	S	D	I	Q	S	S	V	R	F	A	S	R	H	R	L	R		
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	W	V	W	E	I	G	N	G	V	E	F	C	P	Y	T	I	S	P	M	E	R	R	Q	S	I	C	P	Q	G	R	I	P	F	Y	S	A	V	V	R	S	T	S	D	I	Q	A	S	V	R	F	A	S	R	H	N	R	L	R
<i>Claviceps purpurea</i> P1	W	V	W	E	I	G	N	G	V	E	F	C	P	Y	T	I	S	P	M	E	R	R	Q	S	I	C	P	Q	G	R	I	P	L	Y	S	A	V	V	R	S	T	S	D	I	Q	A	S	V	R	F	A	S	R	H	N	R	L	R
<i>Epichloë festucae</i> E2368	W	V	W	E	T	G	S	G	D	N	E	S	C	.	L	L	V	S	S	S	.	.	E	R	P	Q	E	I	P	C	H	O	G	R	I	P	L	Y	S	A	A	V	K	S	T	A	H	V	Q	G	V	I	R	F	A	K	D	H	N	R	L	R
<i>Epichloë festucae</i> F11	W	V	W	E	T	G	S	G	D	N	E	S	C	.	L	L	V	S	S	S	.	.	E	R	P	Q	E	I	P	C	H	O	G	R	I	P	L	Y	S	A	A	V	K	S	T	A	H	V	Q	G	V	I	R	F	A	K	D	H	N	R	L	R
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	W	V	W	E	T	G	S	G	D	N	E	S	C	.	L	L	V	S	S	S	.	.	E	R	S	Q	E	I	P	C	H	O	G	R	I	P	L	Y	S	A	A	V	K	S	T	A	H	V	Q	G	V	V	R	F	A	K	D	H	N	R	L	R
<i>Epichloë typhina</i> E5819	W	V	W	E	T	G	S	G	D	N	E	S	C	.	L	L	V	S	S	S	.	.	E	R	P	Q	E	I	P	C	H	O	G	R	I	P	L	Y	S	A	A	V	K	S	T	A	H	V	Q	G	V	V	R	F	A	K	D	H	N	R	L	R
<i>Metarhizium acridum</i> CQMA102	W	V	W	E	S	N	G	L	V	E	E	V	C	.	H	V	V	T	S	R	.	.	G	E	S	Q	S	A	C	H	O	G	R	I	P	L	Y	S	V	T	V	Q	S	I	A	Q	T	S	V	R	F	A	K	K	H	S	R	L	R	L		
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	W	V	W	E	S	N	G	L	V	E	E	C	.	H	V	V	T	S	R	.	.	E	E	S	Q	S	A	C	H	O	G	R	I	P	L	Y	S	V	T	V	Q	S	T	I	A	Q	T	S	V	R	F	A	K	K	H	N	R	L	R			
<i>Peridandelula ipomoeae</i> lasaF13	W	V	W	E	S	G	N	V	A	E	E	A	C	.	H	I	M	T	S	P	.	.	G	E	O	R	G	S	A	C	H	O	G	R	I	P	L	Y	S	A	V	V	O	S	T	S	D	I	Q	S	S	V	R	F	A	K	D	H	N	R	L	R

Abb. 6-3: Multi-Proteinsequenzvergleiche von 22 orthologen FAD-abhängige Oxidoreduktase-Genen. Die FAD-abhängige Oxidoreduktase aus *Trichophyton equinum* CBS127.97 konnten nicht in die Analyse einbezogen werden, da die Genomsequenz unvollständig war.

	180	190	200	210	220	230
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	VVRNTGHD	TAGRSSGSDSFOIHC	HRMKQIEYH	DNFRALGSDI	.DRGPAVSVGAGV	TLGEM
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	VVRNTGHD	TAGRSSGSDSFOIHC	HRMKQIEYH	DNFRALGSDI	.DRGPAVSVGAGV	TLGEM
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	VVRNTGHD	TAGRSSGSDSFOIHC	HRMKQIEYH	DNFRALGSDI	.DRGPAVSVGAGV	TLGEM
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	VVRNTGHD	TAGRSSGSDSFOIHC	HRMKQIEYH	DNFRALGSDI	.DRGPAVSVGAGV	TLGEM
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	IVRNTGHD	LAGRSSAPDLSFOI	HTHRLQEQVQ	FHENFQLRGSE	.R.SVGPVSVGAGV	MMGGL
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	VIRNTGHD	LAGRSSAPDLSFOI	HTHRLQEQI	QFHADMRLDGS	NT.SLGPVTVGAGV	MMGNL
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	VIRNTGHD	LAGRSSAPDLSFOI	HTHRLQEQI	QFHADMRLDGS	NT.SLGPVTVGAGV	MMGNL
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	VIRNTGHD	LAGRSSAPDLSFOI	HTHRLQEQI	QFHADMRLDGS	NT.SLGPVTVGAGV	MMGNL
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	VIRNTGHD	LAGRSSAPDLSFOI	HTHRLQEQI	QFHADMRLDGS	NT.SLGPVTVGAGV	MMGNL
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	VIRNTGHD	LAGRSSAPDLSFOI	HTHRLQEQI	QFHADMRLDGS	NT.SLGPVTVGAGV	MMGNL
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	VIRNTGHD	LAGRSSAPDLSFOI	HTHRLQEQI	QFHADMRLDGS	NT.SLGPVTVGAGV	MMGDL
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	VIKNSGHD	TAGRSSAPHSFQI	STSSSLKTI	SLHENFVPRGST	T.GHGPVTVGAGV	MMQEV
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	GRSAAHSHFOI	HTSLKNI	TLHRNFVPAGST	C.GSGPAVTVGAGV	MMQEV
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	VIKNTGHD	SACRSSAPHSFQI	HTSLKNI	TLHRNFVPAGST	C.GSGPAVTVGAGV	MMQQA
<i>Claviceps purpurea</i> P1	VIKNTGHD	SACRSSAPHSFQI	HTSLKNI	TLHRNFVPAGST	C.GSGPAVTVGAGV	MMQQA
<i>Epichloë festucae</i> E2368	VIKNTGHD	ATGRSAAPDLSOI	HTYFLKDI	IHYHDNFLVHG	DAT.GSGPAVTVGAGV	VHSEV
<i>Epichloë festucae</i> F11	VIKNTGHD	ATGRSAAPDLSOI	HTYFLKDI	IHYHDNFLVHG	DAT.GSGPAVTVGAGV	VHSEV
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	VIKNTGHD	ATGRSAAPDLSOI	HTYFLKDI	IHYHDNFLVHG	DAT.GSGPAVTVGAGV	VHSEV
<i>Epichloë typhina</i> E5819	VIKNTGHD	ATGRSAAPDLSOI	HTYFLKDI	IHYHDNFLVHG	DAT.GSGPAVTVGAGV	VHSEV
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	VVKNSGHD	CACRSSSPDSFOI	HTNLKGI	ITYHDNFVSGSA	AKGSGPAVTVGAGV	MHHEV
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	VVKNSGHD	CACRSSSPDSFOI	HTNLKGI	ITYHDNFVSGSA	AKGSGPAVTVGAGV	MHHEV
<i>Penglandula ipomoeae</i> lasaF13	VVKNTGHD	CACRSSSPDSFOI	HTNLKGI	ITYHDNFVSGSA	AKGSGPAVTVGAGV	MHHEV

	240	250	260	270	280	290
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	YARGARDGWV	VVGGECPTVGAAG	GFLOQGGGV	SSFSFIDGLA	VNDNVLEFEV	VTAKGDVVV
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	YARGARDGWV	VVGGECPTVGAAG	GFLOQGGGV	SSFSFIDGLA	VNDNVLEFEV	VTAKGDVVV
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	YARGARDGWV	VVGGECPTVGAAG	GFLOQGGGV	SSFSFIDGLA	VNDNVLEFEV	VTAKGDVVV
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	YARGARDGWV	VVGGECPTVGAAG	GFLOQGGGV	SSFSFIDGLA	VNDNVLEFEV	VTAKGDVVV
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	YAKCALKNGY	IVGGECPTVGAAG	GFLOQGGGV	SDFLSLHHGLA	VNDNALEFEV	VTASGDIVL
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	YAQAARHGYM	VLGGDCPTVGAAG	GFLOQGGGV	ISDFLSLNQGG	FVNDNVLEYEV	VTADGELVV
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	YSQAARNGYM	VLGGDCPTVGAAG	GFLOQGGGV	ISDFLSLNQGG	FVNDNVLEYEV	VTADGELVV
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	YARAAREGYM	VLGGDCPTVGAAG	GFLOQGGGV	ISDFLSLNQGG	FVNDNVLEYEV	VTADGELVV
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	YAQAARHGYM	VLGGDCPTVGAAG	GFLOQGGGV	ISDFLSLNQGG	FVNDNVLEYEV	VTADGELVV
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	YAQAARHGYM	VLGGDCPTVGAAG	GFLOQGGGV	ISDFLSLNQGG	FVNDNVLEYEV	VTADGELVV
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	YAQAARHGYM	VLGGDCPTVGAAG	GFLOQGGGV	ISDFLSLNQGG	FVNDNVLEYEV	VTADGELVV
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	YAHGVKNAYT	ILGGECPTVGAAG	GFLOQGGGV	SSISFTRGLA	VNDNVLEYQV	VTANADLVT
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	NAHGAKNGYI	IVGGECPTVGAAG	GFLOQGGGV	SSISFTRGLA	VNDNVLEYQV	VTANADLVT
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	YVHGAKNGYT	ILGGECPTVGAAG	GFLOQGGGV	SSISFTRGLA	VNDNVLEYQV	VTANADLVT
<i>Claviceps purpurea</i> P1	YVHGAKNGYT	ILGGECPTVGAAG	GFLOQGGGV	SSISFTRGLA	VNDNVLEYQV	VTANADLVT
<i>Epichloë festucae</i> E2368	YKHGIDHKYS	VVGGECPTVGI	VGGFLOQGGGV	SSWSGFTRGLA	VNDNVLEYQV	VTANAEELVI
<i>Epichloë festucae</i> F11	YKHGIDHKYS	VVGGECPTVGI	VGGFLOQGGGV	SSWSGFTRGLA	VNDNVLEYQV	VTANAEELVI
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	YKHGIDHKYS	VVGGECPTVGI	VGGFLOQGGGV	SSWSGFTRGLA	VNDNVLEYQV	VTANAEELVI
<i>Epichloë typhina</i> E5819	YKHGIDHKYS	VVGGECPTVGI	VGGFLOQGGGV	SSWSGFTRGLA	VNDNVLEYQV	VTANAEELVI
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	YSDGVKNDYT	IVGGECPTVGAAG	GFLOQGGGV	SSFSFTRGLA	VNDNVLEYQV	VTADGELVS
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	YSDGAKNGYT	IVGGECPTVGAAG	GFLOQGGGV	SSFSFTRGLA	VNDNVLEYQV	VTADGELVS
<i>Penglandula ipomoeae</i> lasaF13	YAHGVENGYT	IVGGECPTVGAAG	GFLOQGGGV	SSISFTRGLA	VNDNVLEYQV	VTANADLVT

	300	310	320	330	340	350
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	ANDHQNP	DIFWALRGGGG	TFGIVTRATMR	VHLNSPVCVSEV	AVSGLRNN	SNLLWTKGITG
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	ANDHQNP	DIFWALRGGGG	TFGIVTRATMR	VHLNSPVCVSEV	AVSGLRNN	SNLLWTKGITG
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	ANDHQNP	DIFWALRGGGG	TFGIVTRATMR	VHLNSPVCVSEV	AVSGLRNN	SNLLWTKGITG
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	ANDHQNP	DIFWALRGGGG	TFGIVTRATMR	VHLNSPVCVSEV	AVSGLRNN	SNLLWTKGITG
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	ANAIHNS	DLFWALRGGGG	TFGIVTRATMR	VFPDVPVAV	VAELGVQTS	SHSHG.NYSRSLAV
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	ANALQNP	DLFWALRGGGG	TFGIVTRATMR	VFPDVPVAV	IVISEILL	LEAPQAISSSWTQGLSI
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	ANALQNP	DLFWALRGGGG	TFGIVTRATMR	VFPDVPVAV	IVISEILL	LEAPQAISSSWTQGLSI
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	ANTLQNP	DLFWALRGGGG	TFGIVTRATMR	VFPDVPVAV	IVISEILL	LEAPQAISSSWTQGLSI
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	ANALQNP	DLFWALRGGGG	TFGIVTRATMR	VFPDVPVAV	IVISEILL	LEAPQAISSSWTQGLSI
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	ANALQNP	DLFWALRGGGG	TFGIVTRATMR	VFPDVPVAV	IVISEILL	LEAPQAISSSWTQGLSI
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	ANALQNP	DLFWALRGGGG	TFGIVTRATMR	VFPDVPVAV	IVISEILL	LEAPQAISSSWTQGLSI
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	ANENENQ	DLFWALRGGGG	TFGIVQAATIR	VFPDDPVT	VATTMT	IKAAVTNTMFWTEGVRE
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	ANEHENP	DLYWALKGGGG	TFGIVQAATIR	VFPDDPVT	VATTMT	IKAAVTNTMFWTEGVRE
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	ANEDNNQ	DLFWALKGGGG	TFGIVQAATIR	VFPDDPVT	VATTMT	IKAAVTNTMFWTEGVRE
<i>Claviceps purpurea</i> P1	ANEDNNQ	DLFWALKGGGG	TFGIVQAATIR	VFPDDPVT	VATTMT	IKAAVTNTMFWTEGVRE
<i>Epichloë festucae</i> E2368	ANEHQNP	DLFWALRGGGG	TFGIVQAATIR	VFPDDPVT	VVSTLVLS	STRADTSFVWKAISR
<i>Epichloë festucae</i> F11	ANEHQNP	DLFWALRGGGG	TFGIVQAATIR	VFPDDPVT	VVSTLVLS	STRADTSFVWKAISR
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	ANEHQNP	DLFWALRGGGG	TFGIVQAATIR	VFPDDPVT	VVSTLVLS	STRADTSFVWKAISR
<i>Epichloë typhina</i> E5819	ANEHQNP	DLFWALRGGGG	TFGIVQAATIR	VFPDDPVT	VVSTLVLS	STRADTSFVWKAISR
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	ANENQNP	DLFWALKGGGG	TFGIVQAATIR	VFPDDPVT	VVAISIS	ISTSLTNRLFTEGVRE
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	ANEYQNP	DLFWALKGGGG	TFGIVQAATIR	VFPDDPVT	VVAISIS	ISTSLTNRLFTEGVRE
<i>Penglandula ipomoeae</i> lasaF13	ANEHENQ	DLYWALKGGGG	TFGIVQAATIR	VFPDDPVT	VVATTM	IKTAFTLFWTEGVRE

Fortsetzung Abb. 6-3:

	360	370	380	390	400	410
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	LFSILRSF	NQGGIP	GGFILR	PLSKDQ	VNASLT	LYSLNT
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	LFSILRSF	NQGGIP	GGFILR	PLSKDQ	VNASLT	LYSLNT
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	LFSILRSF	NQGGIP	GGFILR	PLSKDQ	VNASLT	LYSLNT
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	LFSILRSF	NQGGIP	GGFILR	PLSKDQ	VNASLT	LYSLNT
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	FFNLIQT	LNRESV	GGQLIMT	VISEHS	IQVKL	KLFFLN
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	VLTAALQ	SLNRDNV	GGQLVIA	VLPLK	LAVQAS	IKFFF
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	VLTAALQ	SLNRDNV	GGQLVIA	VLPLK	LAVQAS	IKFFF
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	ILNALQ	SLNRDDV	GGQLVIA	VQPEL	LAVQAS	IKFFF
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	VLTAALQ	SLNRDNV	GGQLVIA	VLPLK	LAVQAS	IKFFF
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	VLTAALQ	SLNRDNV	GGQLVIA	VLPLK	LAVQAS	IKFFF
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	VLTAALQ	SLNHDNV	GGQLVIA	VLPLK	LAVQAS	IKFFF
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	LFRLVQH	FNDMHI	PGQLVMT	RPTTDS	MQATLE	LHFFAN
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	LLRVLQH	FNRRLRV	PGQLVVM	RPGNDT	LLALLE	LHFFER
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	LLRLLQ	RFNNLHV	AGQLVISA	PTKDSL	QAAGLE	LHFFAN
<i>Claviceps purpurea</i> P1	LLRLLQ	RFNNLHV	AGQLVISA	PTKDSL	QAAGLE	LHFFAN
<i>Epichloë festucae</i> E2368	LLSILRSC	NQQNVH	GGLIITR	PSVDIL	NAGLTL	HFNSMT
<i>Epichloë festucae</i> F11	LLSILRSC	NQQNVH	GGLIITR	PSVDIL	NAGLTL	HFNSMT
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	LLSILRSC	NQQNVH	GGLIITR	PSVDIL	NAGLTL	HFNSMT
<i>Epichloë typhina</i> E5819	LLSILRSC	NQQNVH	GGLIITR	PSVDIL	NAGLTL	HFNSMT
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	LLRLLR	FFNQGF	FGQIVVM	GPNGQ	SVQATL	EFHFAN
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	LLRLLK	IFNQGF	FGQIVVM	GPNGQ	SVQATL	EFHFAN
<i>Penglandula ipomoeae</i> lasaF13	LLRLLQ	YFNQLH	IPGQLVVT	GPEKDS	IQATLE	LHFFAN

	420	430	440	450	460
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	PFTLASRC	LPKISDA	LRKGP	DMLPVNYGIITG
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	PFTLASRC	LPKISDA	LRKGP	DMLPVNYGIITG
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	PFTLASRC	LPKISDA	LRKGP	DMLPVNYGIITG
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	PFTLASRC	LPKISDA	LRKGP	DMLPVNYGIITG
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	HVTTYEST	LSKLSM	NYRKVP	DIHTDNDYGVLG
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	KYTYSSKN	LPHFSS	SNVROVP	DIHSDNDYGVLG
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	KYAYSSKG	LPHFSS	SNVROVP	DIHADNDYGVLG
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	QYTLSSKA	LPHFSS	SNVROVP	DIHSDNDYGVLG
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	KYTYSSKS	LPHFSS	SNVROVP	DIHSDNDYGVLG
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	KYTYSSKS	LPHFSS	SNVROVP	DVHSDNDYGVLG
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	KYTYSSKN	LPHFSS	SNVROVP	DIHSDNDYGVLG
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	STSTLVRV	QERES	SELRTKP	DIYPPHYGIV
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	STSTSLR	ARERAS	LELRMAP	LITPAQ	SGTIHS
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	SASTSVRV	QKKA	SELRMKP	DLYPPHYGILE
<i>Claviceps purpurea</i> P1	SASTSVRV	QKKA	SELRMKP	DLYPPHYGILE
<i>Epichloë festucae</i> E2368	STTLTSKF	VANINSE	RLMDA	DIHPRGIGTLQ
<i>Epichloë festucae</i> F11	STTLTSKF	VANINSE	RLMDA	DIHPRGIGTLQ
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	SATLSSKF	VANINSE	RLMDA	DIHPRGTGTLQ
<i>Epichloë typhina</i> E5819	STTLTSKF	VANINSE	RLMDA	DIHPRGIGTLQ
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	STNLATR	VQKKA	SEVRLRP	DIYPPQYGI
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	STNLIRV	QKKA	SEVRLRP	DIYPPQYGI
<i>Penglandula ipomoeae</i> lasaF13	STSTSVRV	QKKA	SELRMKP	DIYPPQYGI

	470	480	490	500	510	520
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	HFP	MGPM	DLLFTSNL	GGNV	SANTG	KKH
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	HFP	MGPM	DLLFTSNL	GGNV	SANTG	KKH
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	HFP	MGPM	DLLFTSNL	GGNV	SANTG	KKH
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	HFP	MGPM	DLLFTSNL	GGNV	SANTG	KKH
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	QLPTRPG	DLLFTSNL	GGRV	ISNG	..ELA	ETS
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	NLP	VSAG	DLLFTSNL	GGRV	ISNG	..ELA
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	NLP	MSPG	DLLFTSNL	GGRV	ISNG	..ELA
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	NLP	MSPG	DLLFTSNL	GGRV	ISNG	..ELA
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	NLP	VSAG	DLLFTSNL	GGRV	ISNG	..ELA
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	NIP	VSAG	DLLFTSNL	GGRV	ISNG	..ELA
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	NLP	VSAG	DLLFTSNL	GGRV	ISNG	..ELA
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	QLPLGSN	DIMFTSNL	GGRV	FEEN	..SAID	ISL
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	ELSVSPG	EMIFTSNL	GGRV	FEEN	..TRTD	NA
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	GLTLKPN	DILFTSNL	GGRV	SEN	..TAIE	IA
<i>Claviceps purpurea</i> P1	GLTLKPN	DILFTSNL	GGRV	SEN	..TAIE	IA
<i>Epichloë festucae</i> E2368	KLP	IGPN	DLLFTSNL	GGRV	SEN	..KGLD
<i>Epichloë festucae</i> F11	KLP	IGPN	DLLFTSNL	GGRV	SEN	..KGLD
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	KLP	IGPN	DLLFTSNL	GGRV	SEN	..KGLD
<i>Epichloë typhina</i> E5819	KLP	IGPN	DLLFTSNL	GGRV	SEN	..KGLD
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	NLKLGN	DILFTSNL	GGRV	MDN	..SDID	IP
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	NLNLGN	DILFTSNL	GGRV	MDN	..SDID	IP
<i>Penglandula ipomoeae</i> lasaF13	ELTVRSN	DILFTSNL	GGRV	SKN	..IAID	VP

Fortsetzung Abb. 6-3:

	530	540	550	560	570	580
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	LEELH	SVQMRQLYDIE	PDFRVSYRNL	GDELES	DAQVYWGPN	YKRLLEIKRKWD
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	LEELH	SVQMRQLYDIE	PDFRVSYRNL	GDELES	DAQVYWGPN	YKRLLEIKRKWD
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	LEELH	SVQMRQLYDIE	PDFRVSYRNL	GDELES	DAQVYWGPN	YKRLLEIKRKWD
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	LEELH	SVQMRQLYDIE	PDFRVSYRNL	GDELES	DAQVYWGPN	YKRLLEIKRKWD
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	LQNL	TNIHMPILYAV	PGFQLSYRNV	GDENEKN	FQQVYWGQS	YKRLQLKRRWD
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	RERLT	TNTQMPMLYAL	DPNLKLSYRNV	GDENEKDF	FQQIYWGPN	YKRLSNIKKKWD
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	REKLT	TNIQMPMLYAL	DPKFKLSYRNV	GDENEKN	FQQVYWGPN	YKRLSDIKKKWD
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	LERLT	TNVQMPMLYAL	DPNFKLSYRNV	GDENEKDF	FQQVYWGPN	YKRLSQIKKKWD
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	RERLT	TNTQMPMLYAL	DPNFKLSYRNV	GDENEKDF	FQQIYWGPN	YKRLSDIKKKWD
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	RERLT	TNTQMPMLYAL	DPNFKLSYRNV	GDENEKDF	FQQIYWGPN	YKRLSDIKKKWD
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	RERLT	TNTQMPMLYAL	DPNFKLSYRNV	GDENEKDF	FQQIYWGPN	YKRLSNIKKKWD
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	LENLT	SRDSPILYSID	RDSQVSYRNL	GDEQEKE	FRDRYWGTA	YARLAAIKAKWD
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	LETLT	SRDMPILYSIN	PGAASVSYRNL	GDEQEKE	FQARYWGHQ	YARLAAIKAKWD
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	LNDLT	TARDVPILYSID	PAAKISYRNL	GDEQEKE	FQARYWGADN	YARLAATKAAWD
<i>Claviceps purpurea</i> P1	LNNLT	TARDVPILYSID	PAAKISYRNL	GDEQEKE	FQTRYWGADN	YARLAATKAAWD
<i>Epichloë festucae</i> E2368	LKEIT	TNKYMPILYSMQ	PSFKVSYRNL	GDENEKNY	QEVFWGEKV	YARLASIKAKLD
<i>Epichloë festucae</i> F11	LKEIT	TNKYMPILYSMQ	PSFKVSYRNL	GDENEKNY	QEVFWGEKV	YARLASIKAKLD
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	LDEIT	TNKYMPILYSMQ	PSFKVSYRNL	GDENEKNY	QEVFWGEKV	YARLASIKAKLD
<i>Epichloë typhina</i> E5819	LKEIT	TNKYMPILYSMQ	PSFKVSYRNL	GDENEKNY	QEVFWGEKV	YARLASIKAKLD
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	LETLT	SHDMPILYSLE	PNNKVSYRNL	GDESEKDF	FQNRYYGTA	YARLASIKAKWD
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	LETLT	SHDMPILYSLE	PNNKVSYRNL	GDESEKDF	FQNRYYGTA	YARLASIKAKWD
<i>Periglandula ipomoeae</i> IasaF13	LENLT	SQDIPILYSVD	PNAKISYRNL	GDEQEKE	FQARYWGLDN	YARLAAIKAKWD

	590	600	610	620
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	FSQLGVGSEGWTE	EDQMCKRQQR	...LQQMLQYLMSSIAQRVYR	...
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	FSQLGVGSEGWTE	EDQMCKRQQR	...LQQMLQYLMSSIAQRVYR	...
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	FSQLGVGSEGWTE	EDQMCKRQQR	...LQQMLQYLMSSIAQRVYR	...
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	FSQLGVGSEGWTE	EDQMCKRQQR	...LQQMLQYLMSSIAQRVYR	...
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	ISKLGVGSEBWD	SEGMCRTRRR	...SWKE	...
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	FSKLGVGSEBWD	SEGMCRKSRN	...ALHQKVTRFLSFPTSIFEGITLWR	...
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	FSKLGIGSEBWD	SEGMCRKHQE	...AFYQKMRRFISLTTFTLKN	...
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	FSKLGVGSEBWD	SEGMCRKNQS	...VVRQAVNYLMSFATSMVEG	...
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	FSKLGVGSEBWD	SEGMCRKSRN	...ALHQKVTRIISFTTSIWSR	...
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	FSKLGVGSEBWD	SEGMCRKSRD	...ALHQKITRFISFPTSIIWRG	...
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	FSKLGVGSEBWD	SEGMCRKSRN	...ALHQKVTRFISFPTSILRG	...
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	MSKLGVGSEBWD	EEGICRKS LG	...FVERLSAILKLERWKN	...
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	IARAGVGSEBWD	AEGICKVF	RNNSGDFVSKYPGPFLGVH	...
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	MTSLGVGSEBWD	AEGICRKR RG	...FRAKAS.SLIGM	...
<i>Claviceps purpurea</i> P1	MTSLGVGSEBWD	AEGICRKR RG	...FRAKAS.SLIGM	...
<i>Epichloë festucae</i> E2368	ISKLGVGSEBWD	TEGMCYQP	QN...RVSQPLRSLKYFLSVLKDT	...
<i>Epichloë festucae</i> F11	ISKLGVGSEBWD	TEGMCYQP	QN...RVSQPLRSLKYFLSVLKDT	...
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	ISKLGVGSEBWD	AEGMCYQP	QN...RVSQPLRSLQYFLSVLKDT	...
<i>Epichloë typhina</i> E5819	ISKLGVGSEBWD	TEGMCYQP	QN...RVSQPLRSLKYFLSVLKDT	...
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	ITRLGVGSEBWD	TEGMCRRSRG	...LVARVI.ELLRLSGRWTLDNFLL	...
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	ITRLGVGSEBWD	TEGMCRRSIG	...LVARVS.ELLRLSGRWTLGGFSSLIQQVDIIDSSR	...
<i>Periglandula ipomoeae</i> IasaF13	ITRSGVGSEBWD	VEGICRKS RG	...LTAQAL.ELLKLGPIY	...

Fortsetzung Abb. 6-3:

	130										140										150										160										170										180									
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	K	F	Y	T	K	E	G	N	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	L	K	F	P	S	L	M	H	A	Q	R	R	D	P	R	T	N	L	L	N	P	N	Y	W	D	V	T	S	N	H	E	S	L	H				
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	K	F	Y	T	K	E	G	N	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	L	K	F	P	S	L	M	H	A	Q	R	R	D	P	R	T	N	L	L	N	P	N	Y	W	D	V	T	S	N	H	E	S	L	H				
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	K	F	Y	T	K	E	G	N	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	L	K	F	P	S	L	M	H	A	Q	R	R	D	P	R	T	N	L	L	N	P	N	Y	W	D	V	T	S	N	H	E	S	L	H				
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	K	F	Y	T	K	E	G	N	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	L	K	F	P	S	L	M	H	A	Q	R	R	D	P	R	T	N	L	L	N	P	N	Y	W	D	V	T	S	N	H	E	S	L	H				
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	K	F	F	T	S	D	E	G	W	D	V	F	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	A	K	F	P	D	M	I	H	S	O	R	R	D	P	Q	T	N	L	L	N	P	N	M	T	W	D	F	V	T	K	N	P	E	A	L	H		
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	K	F	F	T	S	D	E	G	W	D	V	S	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	A	K	F	P	D	M	I	H	S	O	R	R	D	P	Q	T	N	L	L	N	P	N	M	T	W	D	F	V	T	K	N	P	E	A	L	H		
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	K	F	F	T	S	D	E	G	W	D	V	S	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	A	K	F	P	D	M	I	H	S	O	R	R	D	P	Q	T	N	L	L	N	P	N	M	T	W	D	F	V	T	K	N	P	E	A	L	H		
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	K	F	F	T	S	D	E	G	W	D	V	S	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	A	K	F	P	D	M	I	H	S	O	R	R	D	P	Q	T	N	L	L	N	P	N	M	T	W	D	F	V	T	K	N	P	E	A	L	H		
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	K	F	F	T	S	D	E	G	W	D	V	S	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	A	K	F	P	D	M	I	H	S	O	R	R	D	P	Q	T	N	L	L	N	P	N	M	T	W	D	F	V	T	K	N	P	E	A	L	H		
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	K	F	F	T	S	D	E	G	W	D	V	S	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	A	K	F	P	D	M	I	H	S	O	R	R	D	P	Q	T	N	L	L	N	P	N	M	T	W	D	F	V	T	K	N	P	E	A	L	H		
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	K	F	F	T	S	D	E	G	W	D	V	S	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	A	K	F	P	D	M	I	H	S	O	R	R	D	P	Q	T	N	L	L	N	P	N	M	T	W	D	F	V	T	K	N	P	E	A	L	H		
<i>Trichophyton verrucosum</i> HK10517	K	F	F	T	S	D	E	G	W	D	V	S	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	A	K	F	P	D	M	I	H	S	O	R	R	D	P	Q	T	N	L	L	N	P	N	M	T	W	D	F	V	T	K	N	P	E	A	L	H		
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	K	L	F	T	G	D	E	G	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	S	K	F	P	D	L	V	H	A	Q	R	R	D	P	A	T	N	L	L	N	P	A	A	W	E	F	V	C	N	N	H	E	T	L	H			
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	K	L	F	T	G	D	E	G	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	S	K	F	P	D	L	V	H	A	Q	R	R	D	P	A	T	N	L	L	N	P	A	A	W	E	F	V	C	N	N	H	E	T	L	H			
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	K	H	F	T	Q	D	G	N	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	S	K	F	P	D	M	V	H	A	Q	R	R	D	P	T	T	N	V	A	N	P	S	R	W	E	F	V	C	N	N	H	E	T	L	H			
<i>Claviceps purpurea</i> P1	K	H	F	T	Q	D	G	N	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	S	K	F	P	D	M	V	H	A	Q	R	R	D	P	T	T	N	V	A	N	P	S	R	W	E	F	V	C	N	N	H	E	T	L	H			
<i>Epichloë festucae</i> E2368	K	F	F	T	Q	E	G	N	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	I	K	F	P	A	L	I	H	A	Q	R	R	D	P	R	T	N	M	T	N	P	R	N	W	E	F	V	C	D	N	H	E	A	L	H			
<i>Epichloë festucae</i> F11	K	F	F	T	Q	E	G	N	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	I	K	F	P	A	L	I	H	A	Q	R	R	D	P	R	T	N	M	T	N	P	R	N	W	E	F	V	C	D	N	H	E	A	L	H			
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	K	F	F	T	Q	E	G	N	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	I	K	F	P	A	L	I	H	A	Q	R	R	D	P	R	T	N	M	T	N	P	R	N	W	E	F	V	C	D	N	H	E	A	L	H			
<i>Epichloë typhina</i> E5819	K	F	F	T	Q	E	G	N	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	I	K	F	P	A	L	I	H	A	Q	R	R	D	P	R	T	N	M	T	N	P	R	N	W	E	F	V	C	D	N	H	E	A	L	H			
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	K	F	F	T	Q	E	G	N	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	I	K	F	P	A	L	V	H	A	Q	R	R	D	P	K	T	N	L	T	N	P	S	K	W	E	F	V	C	N	N	H	E	T	L	H			
<i>Metarhizium anisoplae</i> ARSEF23	K	F	F	T	Q	E	G	N	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	I	K	F	P	A	L	V	H	A	Q	R	R	D	P	K	T	N	L	T	N	P	S	K	W	E	F	V	C	N	N	H	E	T	L	H			
<i>Periglandula isopomaeae</i> lasaF13	K	L	F	T	Q	D	G	N	W	D	V	C	L	N	F	P	F	F	I	R	D	P	S	K	F	P	D	L	V	H	A	Q	R	R	D	P	K	T	N	L	T	N	P	S	K	W	E	F	V	C	N	N	H	E	T	L	H			

Abb. 6-4: Multi-Proteinsequenzvergleiche von 23 orthologen Katalase-Genen.

	190	200	210	220	230	240
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	MVLLQF	SDFGT	TMFNW	RSLSG	YMGHAY	KWVMPNGS
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	MVLLQF	SDFGT	TMFNW	RSLSG	YMGHAY	KWVMPNGS
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	MVLLQF	SDFGT	TMFNW	RSLSG	YMGHAY	KWVMPNGS
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	MVLLQF	SDFGT	TMFNW	RSLSG	YMGHAY	KWVMPNGS
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	MVLLQY	SDFGT	RMFTW	RTLSS	YSGHAF	KWVMPDGS
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	MTLLQH	SDFGT	MTFTW	RTLSS	YVGHAF	KWVMPDGS
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	MTLLQH	SDFGT	MTFTW	RTLSS	YVGHAF	KWVMPDGS
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	MTLLQH	SDFGT	MTFTW	RTLSS	YVGHAF	KWVMPDGS
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	MTLLQH	SDFGT	MTFTW	RTLSS	YVGHAF	KWVMPDGS
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	MTLLQH	SDFGT	MTFTW	RTLSS	YVGHAF	KWVMPDGS
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	MTLLQH	SDFGT	MTFTW	RTLSS	YVGHAF	KWVMPDGS
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	MTLLQH	SDFGT	MTFTW	RTLSS	YVGHAF	KWVMPDGS
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	MAVFLF	TDGFT	TMFDY	RSMSG	YVSHAY	KWVMPDGTW
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	MVMIFF	SDFGT	TMFDY	RSMSG	YVGHAY	KWIKADGTW
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	MVMFQF	SDFGT	TMFDY	RSMSG	YAAHAY	KWVMPDGS
<i>Claviceps purpurea</i> P1	MVMFQF	SDFGT	TMFDY	RSMSG	YAAHAY	KWVMPDGS
<i>Epichloë festucae</i> E2368	MVMFQF	SDFGT	TMFNYS	RSMSA	YVGHAY	KWAMPDGS
<i>Epichloë festucae</i> F11	MVMFQF	SDFGT	TMFNYS	RSMSA	YVGHAY	KWAMPDGS
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	MVMFQF	SDFGT	TMFNYS	RSMSA	YVGHAY	KWAMPDGS
<i>Epichloë typhina</i> E5819	MVMFQF	SDFGT	TMFNYS	RSMSA	YVGHAY	KWAMPDGS
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	MVMFQF	SDFGT	TMFDY	RSMSG	YVGHAY	KWVKPDGS
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	MVMFQF	SDFGT	TMFDY	RSMSG	YVGHAY	KWVKPDGS
<i>Periglandula ipomoeae</i> IasaF13	MVMFQF	SDFGT	TMFDY	RSMSG	YVSHAY	KWVMPDGS

	250	260	270	280	290	300
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	DLDPDH	ATRDLY	EAIERG	DYPTWT	ANVQVVD	PAEAPDL
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	DLDPDH	ATRDLY	EAIERG	DYPTWT	ANVQVVD	PAEAPDL
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	DLDPDH	ATRDLY	EAIERG	DYPTWT	ANVQVVD	PAEAPDL
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	DLDPDH	ATRDLY	EAIERG	DYPTWT	ANVQVVD	PAEAPDL
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	.SEDPF	ASRDLF	EAIERG	DYPSWT	ANVQVVD	PKDAPHL
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	.NDPDR	ATKDLF	EAIERG	DYPSWT	ANVQVVD	PKDAPKL
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	.NDPDR	ATKDLF	EAIERG	DYPSWT	ANVQVID	PKDAPKL
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	.NDPDR	ATKDLF	EAIERG	DYPSWT	ANVQVID	PKDAPKL
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	.NDPDR	ATKDLF	EAIERG	DYPSWT	ANVQVVD	PKDAPKL
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	.NDPDR	ATKDLF	EAIERG	DYPSWT	ANVQVVD	PKDAPKL
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	.NDPDR	ATKDLF	EAIERG	DYPSWT	ANVQVVD	PKDAPKL
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	.NDPDR	ATKDLF	EAIERG	DYPSWT	ANVQVVD	PKDAPKL
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	PNDSES	ATRDLY	QSLERGE	CPSWTV	KVQVID	DPEDAPRL
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	AGDAES	ATRDLY	QSLERGE	CPSWTV	KVQVID	DPEDAPRL
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	ADDAES	ATRDLY	QSLERGE	CPSWTV	KVQVID	DPEDAPKL
<i>Claviceps purpurea</i> P1	ADDAES	ATRDLY	QSLERGE	CPSWTV	KVQVID	DPEDAPKL
<i>Epichloë festucae</i> E2368	PNDLES	ATRDLY	ESIERGG	YPTWT	ANVQVVD	DPEDAHKL
<i>Epichloë festucae</i> F11	PNDLES	ATRDLY	ESIERGG	YPTWT	ANVQVVD	DPEDAHKL
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	PNDLES	ATRDLY	ESIERGG	YPTWT	ANVQVVD	DPEDAHKL
<i>Epichloë typhina</i> E5819	PNDLES	ATRDLY	ESIERGG	YPTWT	ANVQVVD	DPENAHKL
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	PNDQES	ATRDLY	ESLERGE	CPSWT	ANVQVID	DPEDAHKL
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	PDDQES	ATRDLY	ESLERGE	CPSWT	ANVQVID	DPEDAHKL
<i>Periglandula ipomoeae</i> IasaF13	PNDPES	ATRDLY	QSLDRGE	YPTWT	VN	VQVVD

	310	320	330	340	350	360
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	IPSRPF	FGKLT	LNRI	IPDNFF	AEVBEQ	LAFSPSNM
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	IPSRPF	FGKLT	LNRI	IPDNFF	AEVBEQ	LAFSPSNM
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	IPSRPF	FGKLT	LNRI	IPDNFF	AEVBEQ	LAFSPSNM
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	IPSRPF	FGKLT	LNRI	IPDNFF	AEVBEQ	LAFSPSNM
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	IPSRPF	FGKLT	LNRRNV	KDYF	SEVEK	LAFSPSNL
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	IPSRPF	FGKLT	LNRRNV	KDYF	SEVEK	LAFSPSNL
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	IPSRPF	FGKLT	LNRRNV	KDYF	SEVEK	LAFSPSNL
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	IPSRPF	FGKLT	LNRRNV	KDYF	SEVEK	LAFSPSNL
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	IPSRPF	FGKLT	LNRRNV	KDYF	SEVEK	LAFSPSNL
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	IPSRPF	FGKLT	LNRRNV	KDYF	SEVEK	LAFSPSNL
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	IPSRPF	FGKLT	LNRRNV	KDYF	SEVEK	LAFSPSNL
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	IPSRPF	FGKLT	LNRRNV	KDYF	SEVEK	LAFSPSNL
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	IPERCV	GKLT	LTKKGP	ENYF	EBEQ	LAFSPSHL
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	VSPRRV	GKLT	LTKKGP	DFAE	EBEQ	LAFSPSNL
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	IPGRTL	GKLT	LTKKGP	QDYF	EBEQ	LAFSPSRL
<i>Claviceps purpurea</i> P1	IPGRTL	GKLT	LTKKGP	QDYF	EBEQ	LAFSPSRL
<i>Epichloë festucae</i> E2368	IPSRPF	FGKLT	LTKKNPK	KDYF	QEBEQ	LAFSPSHL
<i>Epichloë festucae</i> F11	IPSRPF	FGKLT	LTKKNPK	KDYF	QEBEQ	LAFSPSHL
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	IPSRPF	FGKLT	LTKKNPK	KDYF	QEBEQ	LAFSPSHL
<i>Epichloë typhina</i> E5819	IPSRPF	FGKLT	LTKKNPK	KDYF	QEBEQ	LAFSPSHL
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	IPSRPF	FGKLT	LTKKGP	KDYF	QEBEQ	LAFSPSHL
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	IPSRPF	FGKLT	LTKKGP	KDYF	QEBEQ	LAFSPSHL
<i>Periglandula ipomoeae</i> IasaF13	IPSRPF	FGKLT	LTKKGP	KDYF	EBEQ	LAFSPSHL

Fortsetzung Abb. 6-4:

	370	380	390	400	410	420
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	PNHHKIPVNQCPMTFNP	TLRDGTGTF	FDANYGSLPGYVSE	SQGVNFARPQEHDP	KFN	AWLS
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	PNHHKIPVNQCPMTFNP	TLRDGTGTF	FDANYGSLPGYVSE	SQGVNFARPQEHDP	KFN	AWLS
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	PNHHKIPVNQCPMTFNP	TLRDGTGTF	FDANYGSLPGYVSE	SQGVNFARPQEHDP	KFN	AWLS
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	PNHHKIPVNQCPMTFNP	TLRDGTGTF	FDANYGSLPGYVSE	SQGVNFARPQEHDP	KFN	AWLS
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	KALPKQ.....EPLR	TSAGRNQASLG.....	KDFA	DWVA		
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	IDHLK.....APLR	RKET.ACQHDLG.....	PEFE	KWLS		
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	IDHLK.....APLR	RKET.SCQDDL.....	PEFE	KWLS		
<i>Arthroderma otiae</i> CBS113480	IDHLK.....APIR	RKET.SCKHDLG.....	PEFE	KWLS		
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	IDHLK.....APLR	RKET.ACQDDL.....	PEFE	KWLS		
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	IDHLK.....APLR	RKET.ACQDDL.....	PEFE	KWLS		
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	IDHLK.....APLR	RKET.ACQDDL.....	PEFE	KWLS		
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	IDHLK.....APLR	RKET.ACQHDLG.....	PEFE	KWLS		
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	PQFSD.....MAAK	RTGHAANDAPKTKKP.....	AVPLQKQSR	EHABWVS		
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	PQNVDR.....LPAN	BSRTNAAAAAACKP.....	TSQ	EHABWVA		
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	PNNLD.....LPAN	RTKKLA	DGSRPEKAE.....	MAPQKVPSQ	EHADWVS	
<i>Claviceps purpurea</i> P1	PNNLD.....LPAN	RTKKLA	DGARPEKAE.....	MAPQKVPSQ	EHADWVS	
<i>Epichloë festucae</i> E2368	PHNLQ.....LSPN	QTRHTTESTRSRIS.....	ARTKSADP	KHT	AWLS	
<i>Epichloë festucae</i> F11	PHNLQ.....LSPN	QTRHTTESTRSRIS.....	ARTKSADP	KHT	AWLS	
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	PHNLQ.....LSPN	QTRHTTESTRNRIS.....	ARAKSADP	KHT	AWLS	
<i>Epichloë typhina</i> E5819	PHNLQ.....LSPN	QTRHTTESTRSRIS.....	ARTESADP	KHT	AWLS	
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	PHNLE.....MPAN	KPRQAVDDAKAKDA.....	VRPEPKSQ	EHSAWVS		
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	PHNLE.....MPAN	KPRQAVDDAKAKDS.....	VRPEPKSQ	EHSAWVS		
<i>Periglandula ipomoeae</i> IasaF13	PQNLD.....MPAN	RTRHTA	DGAKTKK.....	VVPPEKKSR	EHABWVS	

	430	440	450	460	470	480
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	QLSSRPBWMQTNENDYK	KFP	RDIFYNALPEFRSQEFQ	DKMVENII	ASVAQTRRE	IREKVVHTF
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	QLSSRPBWMQTNENDYK	KFP	RDIFYNALPEFRSQEFQ	DKMVENII	ASVAQTRRE	IREKVVHTF
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	QLSSRPBWMQTNENDYK	KFP	RDIFYNALPEFRSQEFQ	DKMVENII	ASVAQTRRE	IREKVVHTF
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	QLSSRPBWMQTNENDYK	KFP	RDIFYNALPEFRSQEFQ	DKMVENII	ASVAQTRRE	IREKVVHTF
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	QVSSDQVWSQPHEDDYK	FAREYEVLP	EFRSQDFQDRMVERII	ESVSHTRQD	IRSKVYRTF	
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	QVTSSEAWSHPHEDDYK	FAREYEVLP	EFRSQEFQDRMVENLC	KSIAPGPDE	LKRKYDTF	
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	QVTSSEAWSHPHEDDYK	FAREYEVLP	EFRSQEFQDRMVENLC	KSIAPGPDE	LKRKYDTF	
<i>Arthroderma otiae</i> CBS113480	QVTSSEAWSHPHEDDYK	FAREYEVLP	EFRSQEFQDRMVENLY	KSVAGGPED	LKRKYDTF	
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	QVTSSEAWSHPHEDDYK	FAREYEVLP	EFRSQEFQDRMVENLC	KSIAPGPDE	LKRKYDTF	
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	QVTSSEAWSHPHEDDYK	FAREYEVLP	EFRSQEFQDRMVENLC	KSIAPGPDE	LKRKYDTF	
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	QVTSSEAWSHPHEDDYK	FAREYEVLP	EFRSQEFQDRMVENLC	KSIAPGPDE	LKRKYDTF	
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	QVTSSEAWSHPHEDDYK	FAREYEVLP	EFRSQEFQDRMVENLC	KSIAPGPDE	LKRKYDTF	
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	QVTSSEAWSPNETDYK	KFP	REFWKAALPRLRGE	EFQNRLLVNM	AEVSQIPED	LRRKYDTL
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	QVTSSEAWSPNETDYK	KFP	REFWKAALPRLRGE	EFQNRLLVNM	AEVSQIPED	LRRKYDTL
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	QVKSSEWSSEPNETDYK	KFP	REFWKAALPRLRGE	EFQNSLVNMA	KSVSQVPAD	MRRKYVSTL
<i>Claviceps purpurea</i> P1	QVKSSEWSSEPNETDYK	KFP	REFWKAALPRLRGE	EFQNSLVNMA	KSVSQVPAD	MRRKYVSTL
<i>Epichloë festucae</i> E2368	ATVSEAWSPNETDYK	KFP	REFWKAALPRLRGE	EFQNSLVNMA	KSVSQVPHE	LRRKYVHTL
<i>Epichloë festucae</i> F11	ATVSEAWSPNETDYK	KFP	REFWKAALPRLRGE	EFQNSLVNMA	KSVSQVPHE	LRRKYVHTL
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	ETVSEAWSPNETDYK	KFP	REFWKAALPRLRGE	EFQNSLVNMA	KSVSQVPHE	LRRKYVHTL
<i>Epichloë typhina</i> E5819	ETVSEAWSPNETDYK	KFP	REFWKAALPRLRGE	EFQNSLVNMA	KSVSQVPHE	LRRKYVHTL
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	ETTSEBWSQPNELDYK	KFP	REFWKSLLPRLRGE	EFQNNVVVNI	AEVSRTPTA	LRRKYVHTL
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	ETTSEBWSQPNELDYK	KFP	REFWKSLLPRLRGE	EFQNNVVVNI	AEVSRTPTA	LRRKYVHTL
<i>Periglandula ipomoeae</i> IasaF13	QMTSSSSWSQPD	EADYKFP	REFWKAALPRLRGE	EFQNNLVNMS	KSVSQIPVD	LRRKYVHTL

	490	500	510
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	H L V D P E L S A R V K R G V E K M D A S F K Q V S L S R L		
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	H L V D P E L S A R V K R G V E K M D A S F K Q V S L S R L		
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	H L V D P E L S A R V K R G V E K M D A S F K Q V S L S R L		
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	H L V D P E L S A R V K R G V E K M D A S F K Q V S L S R L		
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	A L V S S E L A T R V Q D G V E G V E I S Q G . P N V Q P . . . R L		
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	E L V S S E L A R R L R E G A E A I V A E K A R P D S P S R A Q P G Q L R L		
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	E L V S S E L A R R I R E G T E A I V A E K A R P D S P S R A Q P G Q L R L		
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	E L V S T E L A R R V R E G A E V I V A D M A Q P D S P E R A Q P G Q R L		
<i>Trichophyton equinum</i> CBS127.97	E L V S S E L A R R L R E G V E A I V A E K A R P D S P S R A Q P G Q L R L		
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	E L V S S E L A R R L R E G V E A I V A E K A R P D S P S R A Q P G Q L R L		
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	E L V S S E L A R R L R E G V E A I V A E K A R P D S P S R A Q P G Q L R L		
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	E L V S S E L A R R L R E G A E A I V A E K A R P D S P S R A Q P G Q L R L		
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	A L V A E D D L A S R V E S L T E E M V V P . E Q R P R L		
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	R L V A G D L A E R V E A M T E E M V V T G		
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	A L I A D D L A D R V R T M T E E I V E		
<i>Claviceps purpurea</i> P1	A L I A D D L A D R V R T M T E E I V E		
<i>Epichloë festucae</i> E2368	N L I A T D L A D R V K Q T T E K M V V E K E T T A R L		
<i>Epichloë festucae</i> F11	N L I A T D L A D R V K Q T T E K M V V E K E T T A R L		
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	D L I A T D L A D R V K E T T E K M V V E K E T T R L		
<i>Epichloë typhina</i> E5819	N L I A T D L A D R V K Q T T E K M V V E K E T T A R L		
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	G L V A S D L A E R V E K M T E E L V M E T E K K A K L		
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	G L V A S D L A E R V E K M T E E L V M E V E K K A K L		
<i>Periglandula ipomoeae</i> IasaF13	G L V A E D D L A D R V K A M T E E M I M E S E O R A R L		

Fortsetzung Abb. 6-4:

Abb. 6-5: Multi-Proteinsequenzvergleiche von 22 orthologen Alkohol-Dehydrogenase-Genen. Die Alkohol-Dehydrogenase aus *Trichophyton equinum* CBS127.97 konnten nicht in die Analyse einbezogen werden, da die Genomsequenz unvollständig war.

	180	190	200	210	220	230																																																							
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	T	C	V	A	A	D	A	F	P	L	G	I	R	I	N	N	V	S	P	G	V	T	N	T	P	M	L	P	Q	F	A	P	M	A	K	T	F	E	E	I	E	S	Y	K	K	E	G	L	S	L	I	E	A	E	D	V	A	R	T		
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	T	C	V	A	A	D	A	F	P	L	G	I	R	I	N	N	V	S	P	G	V	T	N	T	P	M	L	P	Q	F	A	P	M	A	K	T	F	E	E	I	E	S	Y	K	K	E	G	L	S	L	I	E	A	E	D	V	A	R	T		
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	T	C	V	A	A	D	A	F	P	L	G	I	R	I	N	N	V	S	P	G	V	T	N	T	P	M	L	P	Q	F	A	P	M	A	K	T	F	E	E	I	E	S	Y	K	K	E	G	L	S	L	I	E	A	E	D	V	A	R	T		
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	T	C	V	A	A	D	A	F	P	L	G	I	R	I	N	N	V	S	P	G	V	T	N	T	P	M	L	P	Q	F	A	P	M	A	K	T	F	E	E	I	E	S	Y	K	K	E	G	L	S	L	I	E	A	E	D	V	A	R	T		
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	H	C	V	A	A	D	A	I	S	E	G	I	R	V	N	N	V	S	P	G	V	T	N	T	P	M	L	P	Q	F	A	P	A	K	T	F	E	E	I	E	Q	S	Y	K	A	E	G	L	T	L	I	E	P	E	D	V	A	R	T		
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	T	C	V	S	Q	D	V	M	P	F	G	I	R	A	N	T	V	S	P	G	I	T	R	T	P	M	L	P	R	F	V	P	N	A	K	T	Q	E	E	V	E	E	T	Y	K	K	E	G	F	S	V	I	E	A	D	D	V	A	R	T	
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	T	C	V	A	Q	D	V	M	P	F	G	I	R	A	N	T	V	S	P	G	I	T	R	T	P	M	L	P	R	F	V	P	N	A	K	T	Q	E	E	V	E	E	T	Y	K	K	E	G	F	S	V	I	E	A	D	D	V	A	R	T	
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	T	C	V	A	Q	D	V	I	P	L	G	I	R	A	N	T	V	S	P	G	I	T	R	T	P	M	L	P	R	F	V	P	N	A	K	T	Q	E	E	V	E	E	T	Y	K	K	E	G	F	S	V	I	E	A	D	D	V	A	R	T	
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	T	C	V	S	Q	D	V	M	P	F	G	I	R	A	N	T	V	S	P	G	I	T	R	T	P	M	L	P	R	F	V	P	N	A	K	T	Q	E	E	V	E	E	T	Y	K	K	E	G	F	S	V	I	E	A	D	D	V	A	R	T	
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	T	C	V	S	Q	D	V	M	P	F	G	I	R	A	N	T	V	S	P	G	I	T	R	T	P	M	L	P	R	F	V	P	N	A	K	T	Q	E	E	V	E	E	T	Y	K	K	E	G	F	S	V	I	E	A	D	D	V	A	R	T	
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	T	C	V	S	Q	D	V	M	P	F	G	I	R	A	N	T	V	S	P	G	I	T	R	T	P	M	L	P	R	F	V	P	N	A	K	T	Q	E	E	V	E	E	T	Y	K	K	E	G	F	S	V	I	E	A	D	D	V	A	R	T	
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	T	C	I	A	A	D	V	F	W	S	G	I	R	V	N	C	V	S	P	G	I	T	N	T	P	L	L	P	Q	F	E	P	K	V	K	T	L	D	E	I	R	K	L	Y	R	E	Q	G	Y	P	T	S	E	A	E	D	V	A	R	T	
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	T	C	I	A	A	D	V	F	W	S	D	I	R	V	N	C	V	S	P	G	I	T	N	T	P	L	L	P	Q	F	E	P	N	A	T	S	L	D	A	I	R	D	I	Y	R	R	Q	G	Y	P	T	C	E	P	E	D	V	A	R	T	
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	T	C	I	A	A	D	V	F	W	S	G	I	R	V	N	C	V	S	P	G	I	T	N	T	P	M	L	P	Q	F	E	P	K	A	K	S	L	D	E	I	K	D	M	Y	R	D	Q	G	Y	P	T	G	E	A	D	G	V	A	R	T	
<i>Claviceps purpurea</i> P1	T	C	I	A	A	D	V	F	W	S	G	I	R	V	N	C	V	S	P	G	I	T	N	T	P	M	L	P	Q	F	E	P	K	A	K	S	L	D	A	I	K	D	M	Y	R	D	Q	G	Y	P	T	G	E	A	D	G	V	A	R	T	
<i>Epichloë festucae</i> E2368	A	C	V	A	T	D	V	F	P	V	G	I	R	V	N	C	V	S	P	G	V	T	N	T	P	L	L	P	Q	F	E	P	N	A	K	S	L	A	E	V	K	S	L	Y	E	S	Q	G	F	S	I	V	E	P	E	D	V	A	R	T	
<i>Epichloë festucae</i> F11	A	C	V	A	T	D	V	F	P	V	G	I	R	V	N	C	V	S	P	G	V	T	N	T	P	L	L	P	Q	F	E	P	N	A	K	S	L	A	E	V	K	S	L	Y	E	S	Q	G	F	S	I	V	E	P	E	D	V	A	R	T	
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	A	C	V	A	T	D	V	F	P	M	G	I	R	V	N	C	V	S	P	G	V	T	K	T	P	L	L	P	Q	F	E	P	N	A	K	S	L	A	E	I	K	S	L	Y	E	R	Q	G	L	S	V	V	E	P	E	D	V	A	R	T	
<i>Epichloë typhina</i> E5819	A	C	V	A	T	D	V	F	P	V	G	I	R	V	N	C	V	S	P	L	V	T	N	T	P	L	L	P	Q	F	E	P	N	A	K	S	L	A	E	V	K	S	L	Y	E	S	Q	G	F	S	I	V	E	P	E	D	V	A	R	T	
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	A	C	V	A	A	D	V	F	P	L	G	I	R	V	N	C	V	S	P	G	I	T	N	T	P	L	L	P	Q	F	E	P	N	A	K	S	L	D	E	I	Q	A	L	Y	A	S	Q	G	L	T	M	C	G	A	D	E	V	A	R	T	
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	A	C	V	A	A	D	V	F	P	L	G	I	R	V	N	C	V	S	P	G	I	T	N	T	P	L	L	P	Q	F	E	P	N	A	K	S	L	D	E	I	Q	A	L	Y	A	S	Q	G	L	T	M	C	G	A	D	E	V	A	R	T	
<i>Periglandula ipomoeae</i> IasaF13	T	C	I	A	A	D	V	F	W	S	G	I	R	V	N	C	V	S	P	G	I	T	N	T	P	L	L	P	Q	F	E	P	K	A	K	S	L	N	E	I	Q	E	I	Y	R	R	Q	G	Y	P	T	S	C	E	A	E	D	V	A	R	T

	240	250	260																					
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	I	V	W	L	L	S	E	D	S	R	P	V	F	G	A	N	I	N	V	G	A	C	M	P
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	I	V	W	L	L	S	E	D	S	R	P	V	F	G	A	N	I	N	V	G	A	C	M	P
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF210	I	V	W	L	L	S	E	D	S	R	P	V	F	G	A	N	I	N	V	G	A	C	M	P
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	I	V	W	L	L	S	E	D	S	R	P	V	F	G	A	N	I	N	V	G	A	C	M	P
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	I	A	W	L	L	S	G	D	S	R	P	V	Y	G	A	N	I	N	V	G	A	C	L	P
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS112371	I	V	W	L	L	S	E	D	S	R	P	V	F	G	A	N	I	N	V	G	A	C	M	P
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS118893	I	V	W	L	L	S	E	D	S	R	P	V	F	G	A	N	I	N	V	G	A	C	M	P
<i>Arthroderma otae</i> CBS113480	I	V	W	L	L	S	E	D	S	R	P	V	F	G	T	N	I	N	V	G	A	C	M	P
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892	I	V	W	L	L	S	E	D	S	C	P	V	F	G	A	N	I	N	V	G	A	C	M	P
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS112818	I	V	W	L	L	S	E	D	S	R	P	V	F	G	T	N	I	N	V	G	A	C	M	P
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI0517	I	V	W	L	L	S	E	D	S	R	P	V	F	G	A	N	I	N	V	G	A	C	M	P
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	I	V	W	L	L	S	E	D	S	R	P	V	Y	G	A	N	I	N	V	G	A	C	P	P
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	I	V	W	L	L	S	D	D	S	R	P	V	Y	G	A	N	I	N	V	G	A	C	P	P
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	I	V	W	L	L	S	E	D	S	I	P	V	Y	G	A	N	I	N	V	G	A	C	P	P
<i>Claviceps purpurea</i> P1	I	V	W	L	L	S	E	D	S	I	P	V	Y	G	A	N	I	N	V	G	A	C	P	P
<i>Epichloë festucae</i> E2368	I	V	W	L	L	S	E	D	S	W	P	V	Y	G	S	N	I	N	V	G	A	S	A	P
<i>Epichloë festucae</i> F11	I	V	W	L	L	S	E	D	S	W	P	V	Y	G	S	N	I	N	V	G	A	S	A	P
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	I	V	W	L	L	S	E	D	S	W	P	V	Y	G	S	N	I	N	V	G	A	S	A	P
<i>Epichloë typhina</i> E5819	I	V	W	L	L	S	E	D	S	W	P	V	Y	G	S	N	I	N	V	G	A	S	A	P
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	I	V	W	L	L	S	E	D	S	H	P	V	Y	G	A	N	I	N	V	G	A	G	V	P
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	I	V	W	L	L	S	E	D	S	H	P	V	Y	G	A	N	I	N	V	G	A	G	V	P
<i>Periglandula ipomoeae</i> IasaF13	I	V	W	L	L	S	D	D	S	R	P	V	Y	G	A	N	I	N	V	G	A	C	P	P

Fortsetzung Abb. 6-5:

	1	10	20	30	40	50	60
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	MREEP	SSAQLFKPLKV	GRCHLOHRMIMAP	TTFRADGQ	GVPLP	FVQEYVG	QRASVPGTLL
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	MREEP	SSAQLFKPLKV	GRCHLOHRMIMAP	TTFRADGQ	GVPLP	FVQEYVG	QRASVPGTLL
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af210	MREEP	SSAQLFKPLKV	GRCHLOHRMIMAP	TTFRADGQ	GVPLP	FVQEYVG	QRASVPGTLL
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	MREEP	SSAQLFKPLKV	GRCHLOHRMIMAP	TTFRADGQ	GVPLP	FVQEYVG	QRASVPGTLL
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	MTKTT	QNSMLFNSLHV	GSCHLOHRLIMAP	TTTRYRADDS	STQLP	FVKEYYG	QRASVPGTLL
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	...	MSSSNLFKPIPL	GRKVLQHKVVLSP	MTFRADND	GVPLP	YVKSYYG	QRASVPGTLL
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	...	MPTSKLFDACPL	GTSLLEHKAIVLS	PMTRFRADND	GVPLP	SVKTYVA	QRASVPGTLL
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	...	MSTSNLFNTVPF	GKNVLNKHIVLS	PMTRFRADND	GVPLP	YMKTFYA	QRASVPGTLL
<i>Claviceps purpurea</i> P1	...	MSTSNLFSSTVPF	GKNVLNKHIVLS	PMTRFRADND	GVPLP	YMKTFYA	QRASVPGTLL
<i>Epichloë festucae</i> E2368	...	MSTSNLFTPLQF	GKCLLOHKLVLSP	PMTRFRADNE	GVPLP	YVKTYVC	QRASVPGTLL
<i>Epichloë festucae</i> F11	...	MSTSNLFTPLQF	GKCLLOHKLVLSP	PMTRFRADNE	GVPLP	YVKTYVC	QRASVPGTLL
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	...	MSTSNLFTPLQF	GKCLLOHKLVLSP	PMTRFRADNE	GVPLP	YVKTYVC	QRASVPGTLL
<i>Epichloë typhina</i> E5819	...	MSTSNLFTPLQF	GKCLLOHKLVLSP	PMTRFRADNE	GVPLP	YVKTYVC	QRASVPGTLL
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	...	MSTSNLFKSIAPF	GKGVLOHKIVLSP	PMTRFRADDD	GVPLP	YVKTYYS	QRASVPGTLL
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	...	MSTSNLFKPIGPF	GKGVLOHKIVLSP	PMTRFRADDD	GVPLP	YVKTYYS	QRASVPGTLL
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	...	MSTSNLFNELPF	GTSVLQHKIVLSP	PMTRFRADNG	GVPLP	YVKTYVA	QRASVPGTLL

	70	80	90	100	110	120
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	ITEATDITPKAMGYKHVP	PGIWSSEP	QREAWREIVSRVHSSKCC	FIFCQLWATGRAADPDVLA		
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	ITEATDITPKAMGYKHVP	PGIWSSEP	QREAWREIVSRVHSSKCC	FIFCQLWATGRAADPDVLA		
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af210	ITEATDITPKAMGYKHVP	PGIWSSEP	QREAWREIVSRVHSSKCC	FIFCQLWATGRAADPDVLA		
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	ITEATDITPKAMGYKHVP	PGIWSSEP	QREAWREIVSRVHSSKCC	FIFCQLWATGRAADPDVLA		
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	ISEATDISAPATGYAHVP	GIWCAKHIHAWKEIVDEVHSSKGS	FIFCQLWATGRAADPDVLE			
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	ITEAVICPRAKGFSNCP	GIWHQDQIAAWKEVDEVHSSKGS	VIWQLWATGRASDADTLK			
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	ITEGVICPRAKGFPNVP	GIWHRDQIARWKEVDEVHARGCVI	WQLWAGRASDAETLA			
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	VTDAVICPRKGFNPVP	GIWHEKDQIAAWKEVDEVHSSKGS	FIWQLWATGRAADLEALT			
<i>Claviceps purpurea</i> P1	VTDAVICPRKGFNPVP	GIWHEKDQIAAWKEVDEVHSSKGS	FIWQLWATGRAADLEALT			
<i>Epichloë festucae</i> E2368	LTEATAISRRARGFPNVP	GIWSQEQIAGWKEVDAVHAKGSYI	WQLWATGRAAEVGVVK			
<i>Epichloë festucae</i> F11	LTEATAISRRARGFPNVP	GIWSQEQIAGWKEVDAVHAKGSYI	WQLWATGRAAEVGVVK			
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	LTEATAISRRARGFPNVP	GIWSQEQIAGWKEVDAVHAKGSYI	WQLWATGRAAEVGVVK			
<i>Epichloë typhina</i> E5819	LTEATAISRRARGFPNVP	GIWSQEQIAGWKEVDAVHAKGSYI	WQLWATGRAAEVGVVK			
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	ITEAVISPRAKGFPNVP	GIWSQEQIASWKEVDAVHSSKGSYI	WQLWATGRAADVDTLK			
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	ITEAVISPRAKGFPNVP	GIWSQEQIASWKEVDAVHSSKGSYI	WQLWATGRAADMDTLK			
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	ITEAVICPRAKGFPNVP	GIWHDSDQIAAWKGVDEVHSSKGS	VIWQLWATGRAVDPDTLT			

	130	140	150	160	170
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	DMK.DLISSSAVPVEEKG	PLPRALTEDEIQQCIA	DFAQAARNAIN	AGFDGVEIHGANGY	
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	DMK.DLISSSAVPVEEKG	PLPRALTEDEIQQCIA	DFAQAARNAIN	AGFDGVEIHGANGY	
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af210	DMK.DLISSSAVPVEEKG	PLPRALTEDEIQQCIA	DFAQAARNAIN	AGFDGVEIHGANGY	
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	DMK.DLISSSAVPVEEKG	PLPRALTEDEIQQCIA	DFAQAARNAIN	AGFDGVEIHGANGY	
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	AKGLELVSSSAVALEG	GPTPRALVDAEIQYIN	DFSQAARNAME	AGFDGVEIHGANGF	
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	ESGFHLESSSDVPVAPGE	PTPRALSDDEINSYIG	DFVQA	AKNAVLEAGFDGVEIHGANGF	
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	SNGLDLESSSDVPLAPGD	PAPRPLREEEIRS	VILAYAQAFNAVHE	AGFDGVEIHGANGF	
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	SQGLKLESSSEVPVAPGE	PTPRALDEDEIQQYIL	DYVQGA	AKNAVHAGAGFDGVEIHGANGF	
<i>Claviceps purpurea</i> P1	SQGLKLESSSEVPVAPGE	PTPRALDEDEIQQYIL	DYVQGA	AKNAVHAGAGFDGVEIHGANGF	
<i>Epichloë festucae</i> E2368	ANGFDLVSSSAVPVS	PGEPPTPRALSDDEINSYIG	DFVQA	AKNAVLEAGFDGVEIHGANGF	
<i>Epichloë festucae</i> F11	ANGFDLVSSSAVPVS	PGEPPTPRALSDDEINSYIG	DFVQA	AKNAVLEAGFDGVEIHGANGF	
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	ANGFDLVSSSAVPVS	PGEPPTPRALSDDEINSYIG	DFVQA	AKNAVLEAGFDGVEIHGANGF	
<i>Epichloë typhina</i> E5819	ANGFDLVSSSAVPVS	PGEPPTPRALSDDEINSYIG	DFVQA	AKNAVLEAGFDGVEIHGANGF	
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	ANGFEIVSSSATPVGPDE	PTPRALTEDEITSYIA	DYVQGA	AKNAVFGAGFDGVEIHGANGF	
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	ANGLELVSSSATPVGPDE	PTPRALTEDEITSYIA	DYVEGA	AKNAVFGAGFDGVEIHGANGF	
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	SNGLELKSSESEVPVAPGE	PTPRALSEEEIQSYIF	DYAQGA	AKNAVHAGAGFDGVEIHGANGF	

Abb. 6-6: Multi-Proteinsequenzvergleiche von 16 orthologen *old yellow enzyme*-Genen.

	180	190	200	210	220	230
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	LIDQFTQKS	CNHRQDRWGGSTENRAREFA	VELTRA	VEAVGAD	RVGKLS	SPYSQYLGMGTM
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	LIDQFTQKS	CNHRQDRWGGSTENRAREFA	VELTRA	VEAVGAD	RVGKLS	SPYSQYLGMGTM
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af210	LIDQFTQKS	CNHRQDRWGGSTENRAREFA	VELTRA	VEAVGAD	RVGKLS	SPYSQYLGMGTM
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	LIDQFTQKS	CNHRQDRWGGSTENRAREFA	VELTRA	VEAVGAD	RVGKLS	SPYSQYLGMGTM
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	LIDQFTQAS	CNQRSDQWGGSTVNRSRFL	VEVTKAV	VAVIGAP	RVGVKLS	PWSQYLGMGTM
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	LVDQFLQAS	CNTRADQWGGSTENRSREF	LEITRRV	VDAVGK	DHVGKLS	PWSTFQGMGTM
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	LIDQFLQSS	CNHRQDRWGGSTENRSREF	LEIARRV	VDAVGK	DRVGKLS	PWSTFQGMGTM
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	LVDQFLQSS	CNRRQDRWGGSTENRSREF	LEITRGV	VDAVGK	DRVGMKLS	PWSTFQGMGTM
<i>Claviceps purpurea</i> P1	LIDQFLQSS	CNRRQDRWGGSTENRSREF	LEITRGV	VDAVGK	DRVGMKLS	PWSTFQGMGTM
<i>Epichloë festucae</i> E2368	LIDQFLQSP	CNQRQDRWGGSTENRSREF	LEITRRV	VIDAVGK	DHVGKLS	TWSTFQGMGTM
<i>Epichloë festucae</i> F11	LIDQFLQSP	CNQRQDRWGGSTENRSREF	LEITRRV	VIDAVGK	DHVGKLS	TWSTFQGMGTM
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	LIDQFLQSS	CNQRQDRWGGSTENRSREF	LEITRRV	VIDAVGK	DHVGKLS	TWSTFQGMGTM
<i>Epichloë typhina</i> E5819	LIDQFLQSP	CNQRQDRWGGSTENRSREF	LEITRRV	VIDAVGK	DHVGKLS	TWSTFQGMGTM
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	LIDQFLQSS	CNQRQDRWGGSTENRSREF	LEITKQV	IDAIGR	DRVGMKLS	TWSTFQGMGTM
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	LIDQFLQSS	CNQRQDRWGGSTENRSREF	LEITKQV	IDAIGR	DRVGMKLS	TWSTFQGMGTM
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	LIDQFLQSS	CNRRQDRWGGSTENRSREF	LEITRRV	VIDAVGK	DRVGMKLS	PWSTFQGMGTM

	240	250	260	270	280	290
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	DELVPQFEY	LIAQMRRLD	VAYLHLANS	RWLDEE	...KPH	HPDPNH
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	DELVPQFEY	LIAQMRRLD	VAYLHLANS	RWLDEE	...KPH	HPDPNH
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af210	DELVPQFEY	LIAQMRRLD	VAYLHLANS	RWLDEE	...KPH	HPDPNH
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	DELVPQFEY	LIAQMRRLD	VAYLHLANS	RWLDEE	...KPH	HPDPNH
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	NDLVAQFEY	LISELKGCD	ISYDLHLANS	RWLDEE	...KVH	PDPHH
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	DDLVAQFEH	FISRLREMD	IAYLHLANS	RWLDEE	...EPG	IKTHPDV
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	HDLVPQFQH	FITALRMD	IAYLHLANS	RWLDEE	...DPG	IKTHPDV
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	DDLVPQFEH	FITCLREMD	IAYLHLANS	RWLDEE	...DPS	IRTHP
<i>Claviceps purpurea</i> P1	DDLVPQFEH	FITCLREMD	IAYLHLANS	RWLDEE	...DPS	IRTHP
<i>Epichloë festucae</i> E2368	DDLIPQFEH	FIMRLREIG	IAYLHLANS	RWLDEE	...DPT	IRTHP
<i>Epichloë festucae</i> F11	DDLIPQFEH	FIMRLREIG	IAYLHLANS	RWLDEE	...DPT	IRTHP
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	DDLIPQFEH	FIMRLREIG	IAYLHLANS	RWLDEE	...DPT	IRTHP
<i>Epichloë typhina</i> E5819	DDLIPQFEH	FIMRLREIG	IAYLHLANS	RWLDEE	...DPT	IRTHP
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	EDLVPQFHY	FLSHLAE	MDIAYVHLANS	RWLDEE	...DPT	IRTHP
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	EDLVPQFQH	FLTHLAE	MDIAYVHLANS	RWLDEE	...DPT	IRTHP
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	DDLVPQFEH	FITCLREMD	IAYLHLANS	RWLDEE	...DPS	IKTHPDV

	300	310	320	330	340	350
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	AGGYDAA	SAEKVTEQMA	AAATYT	NVAIAFGRY	FISTPDL	PFRVMAGIQ
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	AGGYDAA	SAEKVTEQMA	AAATYT	NVAIAFGRY	FISTPDL	PFRVMAGIQ
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af210	AGGYDAA	SAEKVTEQMA	AAATYT	NVAIAFGRY	FISTPDL	PFRVMAGIQ
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	AGGYDAA	SAEKVTEQMA	AAATYT	NVAIAFGRY	FISTPDL	PFRVMAGIQ
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	AGGYDAE	SARHLVEEL	YKGYDNVA	VAFGRF	FISNPDL	AFRVK
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	AGGYDAD	SARRLVDET	YSQNNIM	VVFGRHY	ISNPDL	PFRRL
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	AGGYDAD	SARRLVDET	YSQNNIM	VVFGRHY	ISNPDL	PFRRL
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	AGGYDAD	SARRLVDET	YSQNNIM	VVFGRHY	ISNPDL	PFRRL
<i>Claviceps purpurea</i> P1	AGGYDAD	SARRLVDET	YSQNNIM	VVFGRHY	ISNPDL	PFRRL
<i>Epichloë festucae</i> E2368	AGGYDPE	SAKL	VVDETYS	DKNIG	VVFGRHY	ISNPDL
<i>Epichloë festucae</i> F11	AGGYDPE	SAKL	VVDETYS	DKNIG	VVFGRHY	ISNPDL
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	AGGYDPE	SAKL	VVDETYS	DKNIG	VVFGRHY	ISNPDL
<i>Epichloë typhina</i> E5819	AGGYDPE	SAKL	VVDETYS	DKNIG	VVFGRHY	ISNPDL
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	AGGYDAE	SAQR	VVDETYS	AKQDNV	VVFGRHY	ISNPDL
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	AGGYDAD	SAQR	VVDETYS	AKQNNV	VVFGRHY	ISNPDL
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	AGGYNDP	SARRLVDET	YSQNNIM	VVFGRHY	ISNPDL	PFRRL

	360	370
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	SR	EGYLDYPFSAEY
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	SR	EGYLDYPFSAEY
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af210	SR	EGYLDYPFSAEY
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	SR	EGYLDYPFSAEY
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	SA	KGYLDYQFSP
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	SD	EGYLDYPFQ
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	SE	EGYVDYPFCK
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	SG	EGYVDYPFCK
<i>Claviceps purpurea</i> P1	R	ERAMWTIPSV
<i>Epichloë festucae</i> E2368	S	EGYLDYPFSE
<i>Epichloë festucae</i> F11	S	EGYLDYPFSE
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	S	EGYLDYPFSE
<i>Epichloë typhina</i> E5819	S	EGYLDYPFSE
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	S	EGYLDYPFSE
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	S	EGYLDYPFSE
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	SG	EGYLDYPFCK

Fortsetzung Abb. 6-6:

	1	10	20	30	40	50
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	MTILVL	GGRGKTASR	LSLL	LDNA	GVVFLV	GSSTSYVGPYKMTH..FDWLNE
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	MTILVL	GGRGKTASR	LSLL	LDNA	GVVFLV	GSSTSYVGPYKMTH..FDWLNE
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af210	MTILVL	GGRGKTASR	LSLL	LDNA	GVVFLV	GSSTSYVGPYKMTH..FDWLNE
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	MTILVL	GGRGKTASR	LSLL	LDNA	GVVFLV	GSSTSYVGPYKMTH..FDWLNE
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	MTIFVL	GGRGKTASR	LAALL	DHAKT	PPFLV	GSSTSLTSPYIFSQ..FDWLEK
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	MTILLT	GGSGKTAGH	IANLL	KEAKL	PPFIV	GSRSNPHTVRHR..FDWLDE
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	MTILLT	GGNGKTTTRQ	IARLF	EELAKL	PPVTA	SRSPSHPAAKVHRK..FDWLDE
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	MTVLLT	GGTGRTAKH	IAGIF	RQTNV	PPFLV	ASRSSSAGTAENHRK..FDWLDE
<i>Claviceps purpurea</i> P1	MTVLLT	GGTGRTAKH	IAGIF	RQTNV	PPFLV	ASRSSSAGTAENHRK..FDWLDE
<i>Epichloë festucae</i> E2368	MTILLT	GGRGKTASH	IASLL	QAQAKV	PPFIV	ASRSSDPSSSSPYQNCFDWLDE
<i>Epichloë festucae</i> F11	MTILLT	GGRGKTASH	IASLL	QAQAKV	PPFIV	ASRSSDPSSSSPYQNCFDWLDE
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	MTILLT	GGRGKTASH	IASLL	QAQAKV	PPFIV	ASRSSN..SSSPYQNCFDWLDE
<i>Epichloë typhina</i> E5819	MTILLT	GGRGKTASH	IASLL	QAQAKV	PPFIV	ASRSSDPSSSSPYQNCFDWLDE
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	MTVLLT	GGRGKTASH	IAALL	DAANL	PPFIA	ASRSCSPDSKYRQLR..FDWLDN
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	MTILLT	GGRGKTASH	IAALL	DAANL	PPFIA	ASRSCSHDSKYRQLR..FDWLDN
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	MTILLT	GGNGKTARH	IAGLL	EEANL	PPFII	GSRSNSPQTIERHRS..FDWLDE

	60	70	80	90	100	110
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	RASLD	GIDPISAVY	LVGGHAP	PELVDPG	IRFINV	VARAQVNR
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	RASLD	GIDPISAVY	LVGGHAP	PELVDPG	IRFINV	VARAQVNR
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af210	RASLD	GIDPISAVY	LVGGHAP	PELVDPG	IRFINV	VARAQVNR
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	RASLD	GIDPISAVY	LVGGHAP	PELVDPG	IRFINV	VARAQVNR
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	QVGKH	GLGAISSVY	LVGGHAP	PELVDPG	IRFINV	VARAQVNR
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	..VDE	GMEPVSVVW	LVSPPI	LDLAPPV	IRFID	FASSRGV
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	..SDD	GMPKPVSAIW	LVSPPI	LDLAPPV	IRFID	FASSRGV
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	..VDQ	GMPKPVSVVW	LVSPPI	LDLAPPV	IRFID	FASSRGV
<i>Claviceps purpurea</i> P1	..VDQ	GMPKPVSVVW	LVSPPI	LDLAPPV	IRFID	FASSRGV
<i>Epichloë festucae</i> E2368	..SKD	SMQPISTIWL	VPPPPI	FDLAPLM	IKFVDF	ASRKG
<i>Epichloë festucae</i> F11	..SKD	SMQPISTIWL	VPPPPI	FDLAPLM	IKFVDF	ASRKG
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	..PKE	GMPKPVSVVW	LVSPPI	LDLAPPV	IRFID	FASSRGV
<i>Epichloë typhina</i> E5819	..SKD	SMQPISTIWL	VPPPPI	FDLAPLM	IKFVDF	ASRKG
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	..PKD	GMPKPVSVVW	LVSPPI	LDLAPPV	IRFID	FASSRGV
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	..PKD	GMPKPVSVVW	LVSPPI	LDLAPPV	IRFID	FASSRGV
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	..PGE	GMPKPVSVVW	LVSPPI	LDLAPPV	IRFID	FASSRGV

	120	130	140	150	160	170
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	HAHL	DSLEDVQYV	VRPPTWF	MENL..LED	PHVSW	IKKED
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	HAHL	DSLEDVQYV	VRPPTWF	MENL..LED	PHVSW	IKKED
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af210	HAHL	DSLEDVQYV	VRPPTWF	MENL..LED	PHVSW	IKKED
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	HAHL	DSLEDVQYV	VRPPTWF	MENL..LED	PHVSW	IKKED
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	HAYL	DSLAVQYV	VRPPTWF	MENL..LED	PHLSW	IKKED
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	HAHL	DTIEGVS	YTVLRP	PTWF	MENFST	TRGEFF
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	HAHL	DSLAVQYV	VRPPTWF	MENL..LED	PHLSW	IKKED
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	HEHL	DSIKDV	YTVLRP	PTWF	MENFST	TRGEFF
<i>Claviceps purpurea</i> P1	HGHL	DSIKDV	YTVLRP	PTWF	MENFST	TRGEFF
<i>Epichloë festucae</i> E2368	HEYLA	SLGGIEY	AVLRPT	PTWF	MENFST	TRGEFF
<i>Epichloë festucae</i> F11	HEYLA	SLGGIEY	AVLRPT	PTWF	MENFST	TRGEFF
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	HEYLA	SLGGIEY	AVLRPT	PTWF	MENFST	TRGEFF
<i>Epichloë typhina</i> E5819	HEYLA	SLGGIEY	AVLRPT	PTWF	MENFST	TRGEFF
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	HEHL	ASMEG	ISYTVLR	PTWF	MENFST	TRGEFF
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	HEHL	ASMEG	ISYTVLR	PTWF	MENFST	TRGEFF
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	HAHL	DSLEG	ISYTVLR	PTWF	MENFST	TRGEFF

	180	190	200	210	220	230
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	VAFS	VLTEWKS	QRAQ	EYFVL	GPELLSYD	QVADILT
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	VAFS	VLTEWKS	QRAQ	EYFVL	GPELLSYD	QVADILT
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af210	VAFS	VLTEWKS	QRAQ	EYFVL	GPELLSYD	QVADILT
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	VAFS	VLTEWKS	QRAQ	EYFVL	GPELLSYD	QVADILT
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	VAFR	CLTQWGS	HKHT	EYFVL	GPELLSYD	QVADILT
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	VALR	ALTAPAL	HNK	DHVL	LGPELLTYD	QVADILT
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	VAFR	ALTADS	IDA	KDLVL	VGPELLTYD	QVADILT
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	VAA	CALTAET	LKNS	DHIL	QGPDLTYD	QVADILT
<i>Claviceps purpurea</i> P1	VAA	CALTAET	LKNS	DHIL	QGPDLTYD	QVADILT
<i>Epichloë festucae</i> E2368	VAFR	TLTDEK	SHNT	DYVL	LGPELLTYD	QVADILT
<i>Epichloë festucae</i> F11	VAFR	TLTDEK	SHNT	DYVL	LGPELLTYD	QVADILT
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	VAFR	TLTDEK	SHNT	DYVL	LGPELLTYD	QVADILT
<i>Epichloë typhina</i> E5819	VAFR	TLTDEK	SHNT	DYVL	LGPELLTYD	QVADILT
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	VAFR	ALKGDL	EYNT	DPIL	LGPELLTYD	QVADILT
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	VAFR	ALKGDL	EYNT	DPIL	LGPELLTYD	QVADILT
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	VALR	ALTGDV	PDKT	DHIL	LGPELLTYD	QVADILT

	240	250	260	270	280	290
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	GLPP	DFAAML	ASMET	VKHG	TEVRNS	HDVKKVT
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af10	GLPP	DFAAML	ASMET	VKHG	TEVRNS	HDVKKVT
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af210	GLPP	DFAAML	ASMET	VKHG	TEVRNS	HDVKKVT
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	GLPP	DFAAML	ASMET	VKHG	TEVRNS	HDVKKVT
<i>Penicillium commune</i> NRRL2033	GLPT	EFAAML	SAMEV	VKNG	SQELLN	NSVEKVT
<i>Claviceps fusiformis</i> PRL1980	GMPA	DEAAMH	ASLDS	IVAGA	BERKLN	TEVKDLT
<i>Claviceps paspali</i> RRC1481	GVPA	DIADMI	ASMDLI	VRSGA	EDRMN	TAVKDF
<i>Claviceps purpurea</i> 20.1	GVT	PEEAYM	HAAMDS	MIKSG	SEERVV	SDEVKAW
<i>Claviceps purpurea</i> P1	GVT	PEEAYM	HAAMDS	MIKSG	SEERVV	SDEVKAW
<i>Epichloë festucae</i> E2368	GMPA	EDAAMH	ASLDS	IVAGA	BERKLN	TEVKDLT
<i>Epichloë festucae</i> F11	GMPA	EDAAMH	ASLDS	IVAGA	BERKLN	TEVKDLT
<i>Epichloë glyceriae</i> E277	GMPA	EDAAMH	ASLDS	IVAGA	BERKLN	TEVKDLT
<i>Epichloë typhina</i> E5819	GMPA	EDAAMH	ASLDS	IVAGA	BERKLN	TEVKDLT
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa102	GMPLE	DAQMH	ASMDLI	VRSGA	EDRMN	TAVKDF
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23	GMPLE	DAQMH	ASMDLI	VRSGA	EDRMN	TAVKDF
<i>Periglandula ipomoeae</i> lasaF13	GMPA	EDAAMH	ASLDS	IVAGA	BERKLN	TEVKDLT

Abb. 6-7: Multi-Proteinsequenzvergleiche von 16 orthologen Reduktase-Genen.

6.2 Phylogenetische Stammbäume der orthologen Ergotalkaloidgene

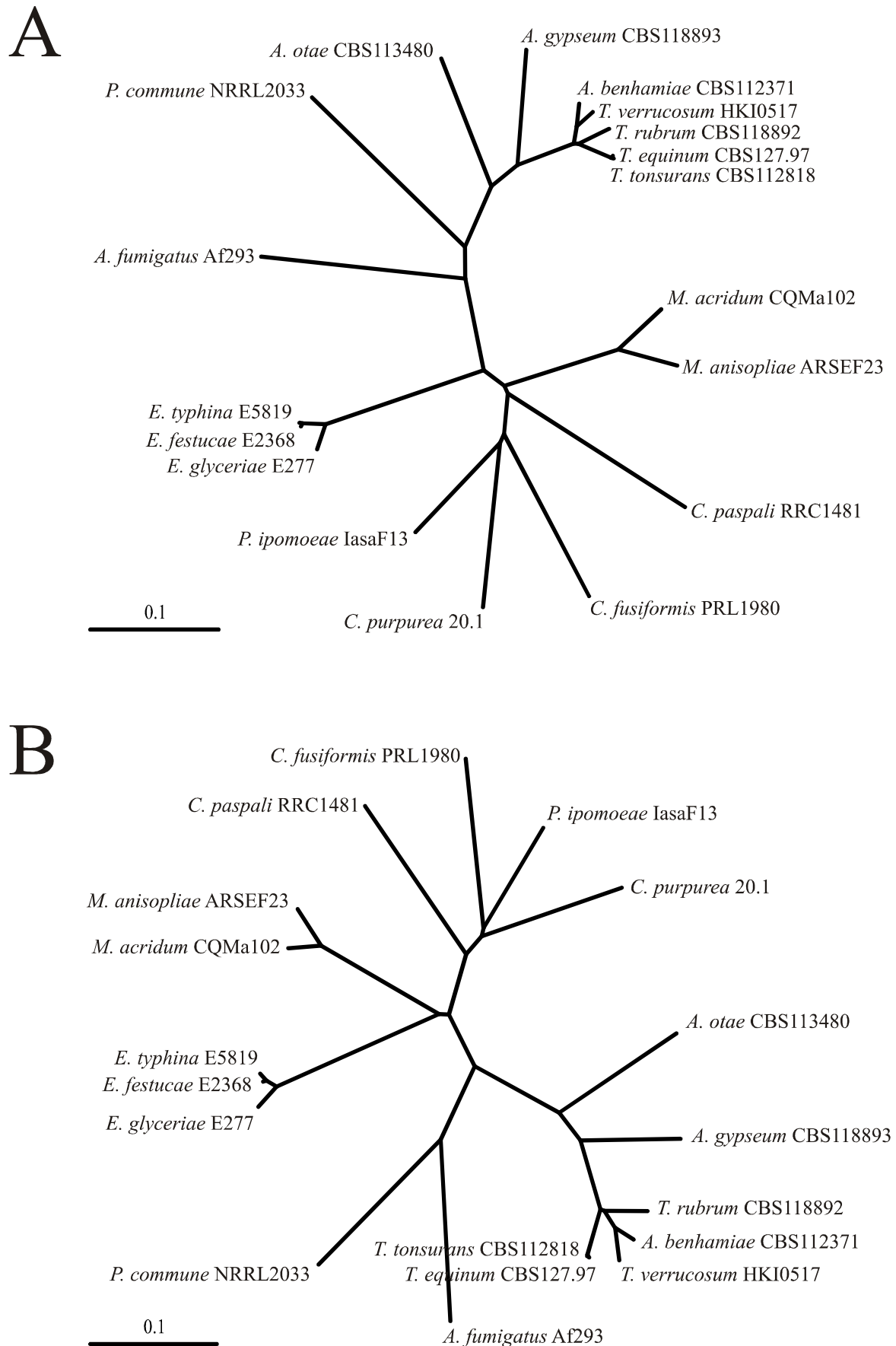


Abb. 6-8: A: Katalysen; B: Dehydrogenasen.

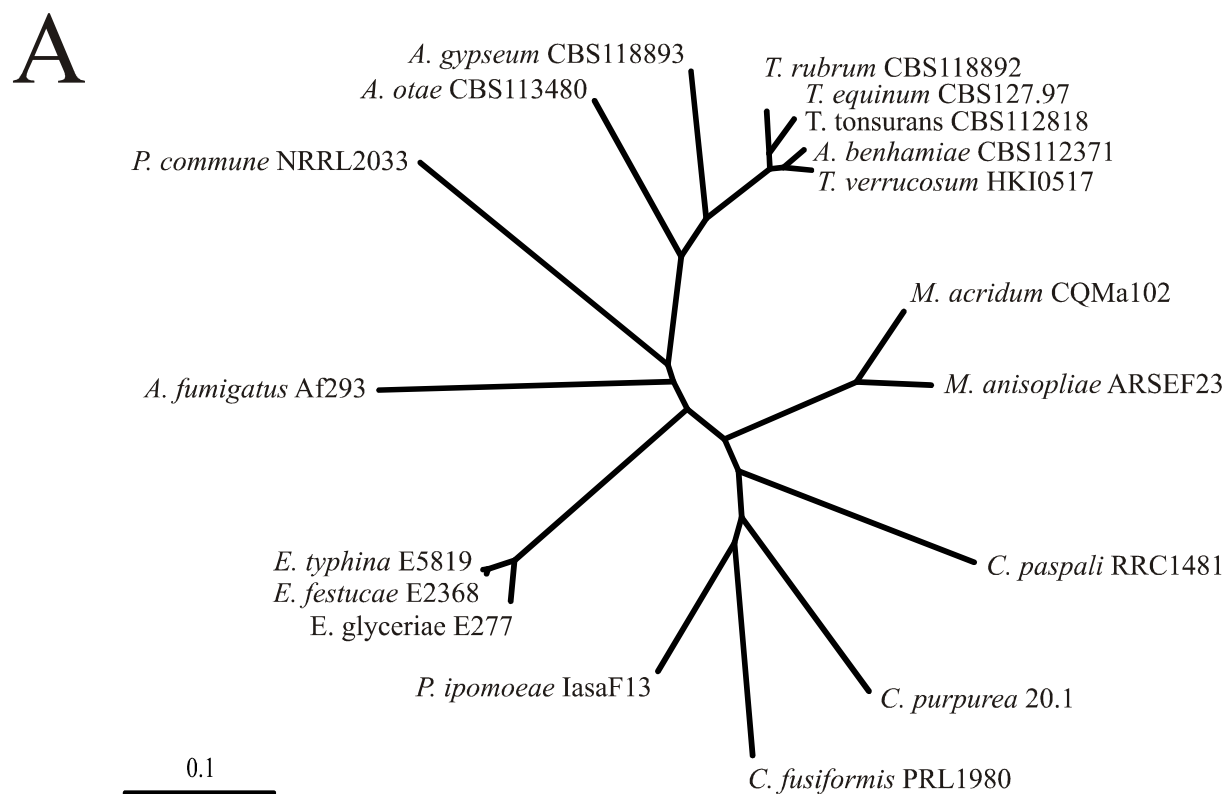
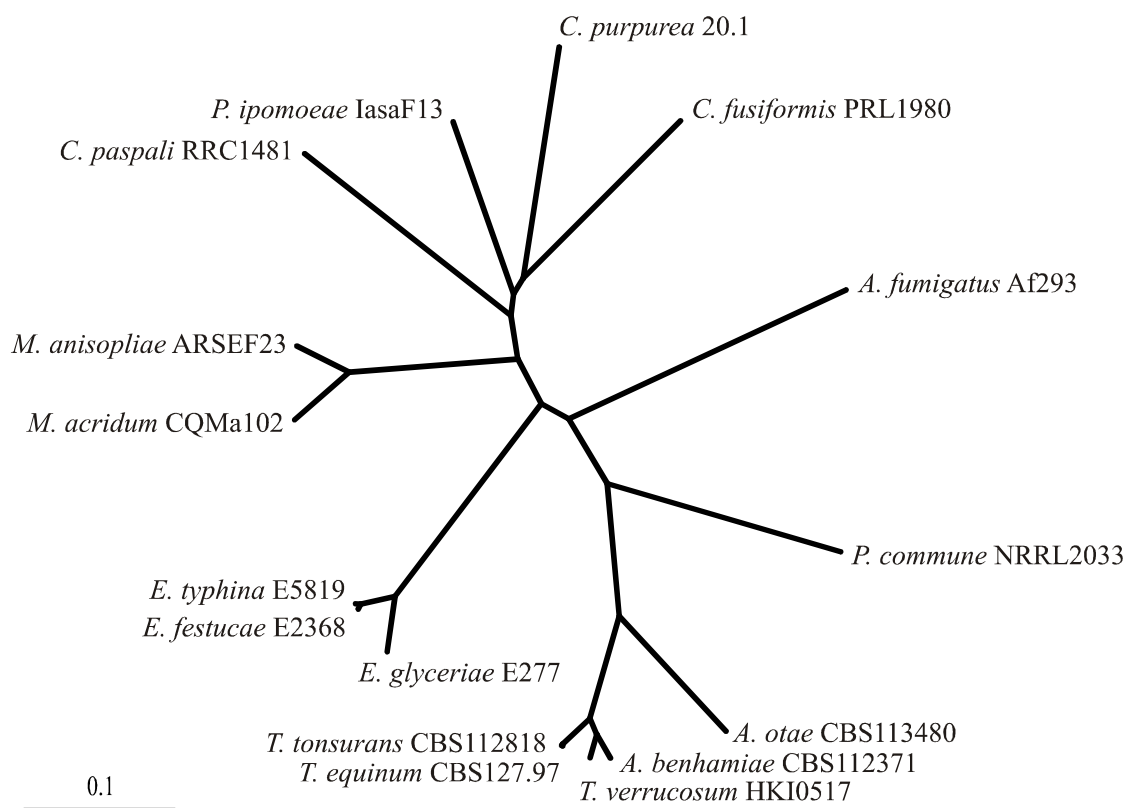


Abb. 6-9: A: N-Methyltransferasen.

A



B

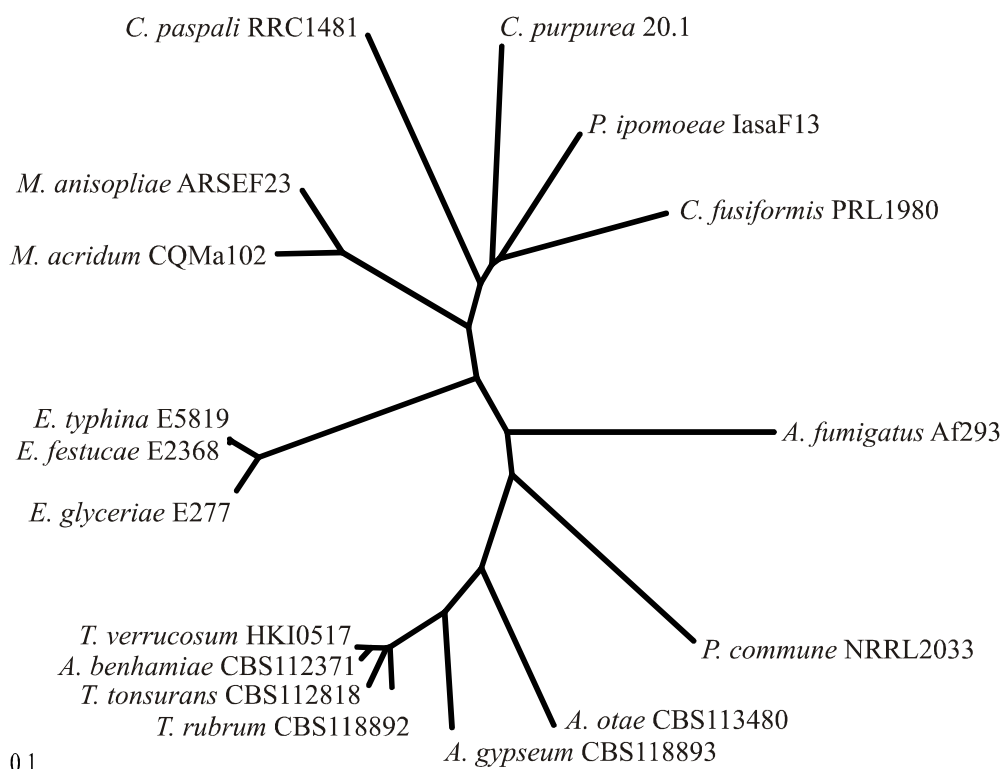
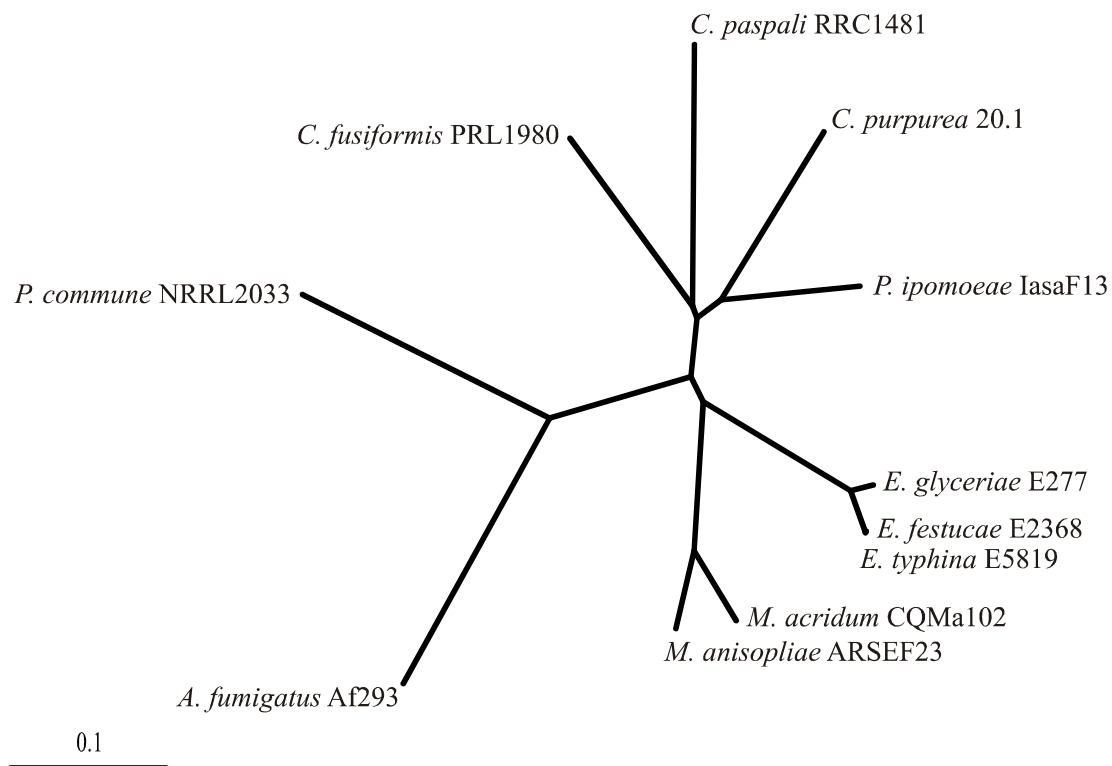
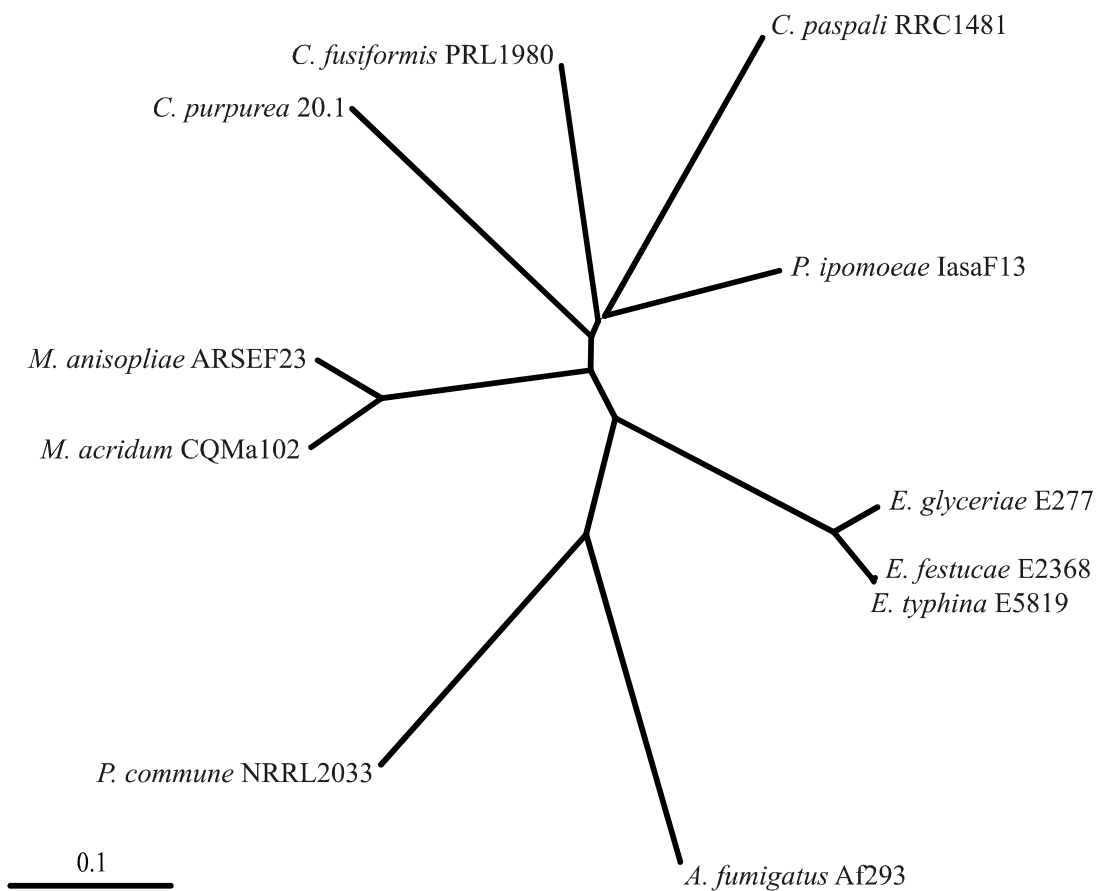


Abb. 6-10: A: Prenyltransferasen, B: FAD-abhängige Oxidoreduktasen.

A



B

Abb. 6-11: A: *old yellow enzymes*, B: *Reduktasen*.

6.3 Vergleich der FgaFS-Sequenz des NCBI-Eintrags mit der FGENESH-Vorhersage

FgaFS_NCBI	MTILVLGGRGKTASRLSLLLDNAGVPFLVGSSSTSYVGPYKMTHTFDWLNEDTWTNVFLRA
FgaFS_FGENESH	MTILVLGGRGKTASRLSLLLDNAGVPFLVGSSSTSYVGPYKMTHTFDWLNEDTWTNVFLRA *****
FgaFS_NCBI	SLDGIDPISAVYLVGGHAPELVDPGIRFINVARAQGVNRFVLLSASNIAKGTHSMGILHA
FgaFS_FGENESH	SLDGIDPISAVYLVGGHAPELVDPGIRFINVARAQGVNRFVLLSASNIAKGTHSMGILHA *****
FgaFS_NCBI	HLDLEDVQYVVL RPTWFMENLLEDPHVSWIKKEDKIYSATGDGKIPFISADDIARVAFS
FgaFS_FGENESH	HLDLEDVQYVVL RPTWFMENLLEDPHVSWIKKEDKIYSATGDGKIPFISADDIARVAFS *****
FgaFS_NCBI	VLTEWKSQRAQEYFVLGPELLSYDQVADILTTVLGRKITHVSLAEADLARLLRDDVGLPP
FgaFS_FGENESH	VLTEWKSQRAQEYFVLGPELLSYDQVADILTTVLGRKITHVSLAEADLARLLRDDVGLPP *****
FgaFS_NCBI	DFAAMLASMETDVKHGTEVRN---SHDVKKVTGS-----
FgaFS_FGENESH	DFAAMLASMETDVKHGTESRKKRAGCGIKGILGGRKSMMTFDPLCHQRFDILHKELAYDS ***** * : . . : * : *
FgaFS_NCBI	-----LPCSFLDFAEQEKARWMRH-----
FgaFS_FGENESH	RPYRLLLI FPAVTKFSQVPTAMSLTTAGSTSF :* :. .*: : .* :

Abb. 6-12: Sequenzvergleich von FgaFS nach der NCBI-Datenbank mit der FGENESH-Vorhersage.

6.4 Vergleich der FgaOx1-Sequenz des NCBI-Eintrags mit der FGENESH-Vorhersage

```

FgaOx1_NCBI      --MSHRILCVAFCVCSLVAVSSIIYSPFHNPIVYSNNAICFQLSTWRIPQLYLAVLIRRF
FgaOx1_FGENESH   MPFVFSFLLGAFLSCIWLSLGGSTCRCP-----GESCWPSPSEWAALNT---
                  : . : * ** * : : * . : . . * * * . : * :

FgaOx1_NCBI      DLSLSTRGVMLAVTVGVGSSQHHSQRSLSLTFAMTPSMITLLVKTCVISQRTAVGEPHR
FgaOx1_FGENESH   ----TLRGDLVEVRP-IAHICHDP-----FYDHSACQNLRLDLAKDSGWRASQAGTL
                  : ** : : * : . * . . * * . . * *

FgaOx1_NCBI      PGWVWEVGRTEDETHAHSRPGAPCHQGRIPLYSAAVESVDQIQVAVRFAQRHRLRLVVR
FgaOx1_FGENESH   QGWVWEVGRTEDETHAHSRPGAPCHQGRIPLYSAAVESVDQIQVAVRFAQRHRLRLVVR
                  *****

FgaOx1_NCBI      NTGHDTAGRSSGSDSFQIHCHRMKQIEYHDNFRALGSDIDRGPVSVGAGVTLGEMYARG
FgaOx1_FGENESH   NTGHDTAGRSSGSDSFQIHCHRMKQIEYHDNFRALGSDIDRGPVSVGAGVTLGEMYARG
                  *****

FgaOx1_NCBI      ARDGWVVVGECPTVGAAGGFLQGGGVSSFHSFIDGLAVDNVLEFEVVTAKGDVVVANDH
FgaOx1_FGENESH   ARDGWVVVGECPTVGAAGGFLQGGGVSSFHSFIDGLAVDNVLEFEVVTAKGDVVVANDH
                  *****

FgaOx1_NCBI      QNPDI FWALRGGGGGT FGIVTRATMRVHLN SPVCVSEVAVSGLRNNSLLWTKGITGLFSI
FgaOx1_FGENESH   QNPDI FWALRGGGGGT FGIVTRATMRVHLN SPVCVSEVAVSGLRNNSLLWTKGITGLFSI
                  *****

FgaOx1_NCBI      LRSFNQQGIPGQFILRPLSKDQVNASLTL YSLNTDDTRRSAENMLSIRNILESTTL PFTL
FgaOx1_FGENESH   LRSFNQQGIPGQFILRPLSKDQVNASLTL YSLNTDDTRRSAENMLSIRNILESTTL PFTL
                  *****

FgaOx1_NCBI      ASRCLPKISDALRKGPDMLPVNYGIITGSVLVSEDLFNSEEGPLHLAKQLEHFPMPGMDL
FgaOx1_FGENESH   ASRCLPKISDALRKGPDMLPVNYGIITGSVLVSEDLFNSEEGPLHLAKQLEHFPMPGMDL
                  *****

FgaOx1_NCBI      LFTSNLGGNVSANTGKKHRDTSMPHGWQRQAHLIN FVRSVSTPTAHEKARSLEELHSVQM
FgaOx1_FGENESH   LFTSNLGGNVSANTGKKHRDTSMPHGWQRQAHLIN FVRSVSTPTAHEKARSLEELHSVQM
                  *****

FgaOx1_NCBI      RQLYDIEPDFRVSYRNLDGPLES DAAQVYWGPNYKRLL EIKRKWDPEDLFFS QLGVGSEG
FgaOx1_FGENESH   RQLYDIEPDFRVSYRNLDGPLES DAAQVYWGPNYKRLL EIKRKWDPEDLFFS QLGVGSEG
                  *****

FgaOx1_NCBI      WTEDQMCK-----RQ-----RLQQMLQY-----
FgaOx1_FGENESH   WTEDQMSPPIIDIRQAGLESSIPDQVVEGLTKEVKTLPALLFYSTKGIQHWNRHSHAADF
                  ***** . ** * : *

FgaOx1_NCBI      -----LMSSIAQRVYR-----
FgaOx1_FGENESH   YPRHEELCILKAEASKMAASIAQDSLVIDMGSASMDKVILLLEALEEQKSITYYALDLS
                  : : ****

FgaOx1_NCBI      -----
FgaOx1_FGENESH   YSELASNFQAIPVDRFH YVRFAALHGT FDDGLHWLQ NAPDIRNRPRCILLFGLTIGNFSR

FgaOx1_NCBI      -----
FgaOx1_FGENESH   DNAASFLRNIAQSALSTSPTQSSIIILRAYTADGVVPFALASLSYANSLFHPKGDRKIFN

FgaOx1_NCBI      -----
FgaOx1_FGENESH   EEDWYFHSEWNHALGRHEASLITQSKDIQLGAPLETVIVRRDEKIRFGCSYKYDKAERDQ

FgaOx1_NCBI      -----
FgaOx1_FGENESH   LFHSAGLEDAAVWTAPDCDVAFYQLRLRLN

```

Abb. 6-13: Sequenzvergleich von FgaOx1 nach der NCBI-Datenbank mit der FGENESH-Vorhersage.

6.5 Klonierungsstrategie für das Gen *fgaOx1*

```

2925661 GCATCTGATCTATTCCATATCTTAGAATTCCTTATGTCACATCGTATCCTTTGCGTCGCC
2925721 TTCTGCGTTTGTCTCTTGTGCTGTGAGCTCGATTTATAGCCCCCGTAAGCTGCTAGC
2925781 GTTTCGAAGAACGTAAATCAAAACGAGATTATAGGTTTAACCATCCCATTGTCTACAGTA
2925841 ACAATGCCATTTGTTTTAGCTTTCTACTTGGCGCATTCTCAGCTGTATTTGGCTGTCC
2925901 TTATCAGGAGGTTTCGACCTGTCGCTGTCGACCAGGGGAGTCATGTTGGCCGTCACCGTCG
2925961 GAGTGGGCAGCTCTCAACACCACTCTCAGAGGTGATTTAGTCGAGGTCCGGCCTATCGCT
2926021 CACATTTGCCATGACCCCTTCTATGATCACTCTGCTTGTCAAACTTGGCTGATCTCGCA
2926081 AAGGACAGCGGTTGGAGAGCCTCACAGGCCGATATGTTTCATTCTGCTACTCGGTCAATTC
2926141 CTTGACACCCATCCCCATAGCGGCATGTTGACTGATTGCCGAATCTGGCGAGGTGACAC
2926201 ACTAGGTACCTTACAGGGCTGGGTTTGGGAGGTTGGTCGCACTGAAGACGAGACATGTCA
2926261 TGCGCATTCTCCGCGTGGTGCGCCCTGTCATCAAGGCCGATTCCACTGTATTCGGCGGC
2926321 AGTTGAGTCTGTTGACCAAATTCAAGTGGCGGTGAGTTTTCGCAACGTCATCGACTGCG
2926381 CTTGGTTGTTTCGCAATACCGGTCATGATACCGCGGGACGATCGAGTGGCTCCGACTCGTT
2926441 CCAGATACATTGCCATCGCATGAAGCAGATCGAGTATCATGACAACTTCCGGGCCCTCGG
2926501 CTCCGATATAGACCGTGGCCAGCCGTGAGCGTAGGCGCTGGAGTGACTCTGGGGGAGAT
2926561 GTATGCAAGAGGTGCCCGTGATGGATGGTGGTTCGTCGGGGGGGAGTGTCTACCGTGGG
2926621 CGCTGCGGGCGGTTTTCTCAGGGAGGCGGAGTGTCCAGTTTCCACAGCTTCATCGACGG
2926681 TCTGGCTGTAGATAATGTCCTCGAATTTGAGGTCGTGACGGCGAAGGTTGGTAGATACAT
2926741 CCTTGATAACTTGCAATATGGTGTCTTTGTAAGTTCCTATGGCTGTGTAGGGAGA
2926801 TGTGTCGTGGCCAATGACCACCAGAACCCAGACATCTTCTGGGCTTTACGGGGAGGGGG
2926861 TGGAGGCACTTTCGGCATCGTTACACGTGCTACAATGAGGGTGCATCTCAATAGCCCCGT
2926921 CTGCGTCTCGGAGGTGGCAGTATCAGGGCTCCGGAATAACTCGTTGCTCTGGACAAAAGG
2926981 GATCACGGGTCTATTTCCATTCTTCGCTCGTTCAACCAGCAGGGGATACCGGGCCAGTT
2927041 TATTCTTCGACCGCTATCCAAGGATCAGGTCAACGCAAGTCTCACACTGTATTCCCTAAA
2927101 CACAGATGACACTCGACGATCGGCCGAGAACATGCTCTCCATTGAAATATCCTCGAATC
2927161 TACCACCCTTCCCTTCACTCTGGCCTCCAGGTGCCTACCAAAGATCAGTGACGCGCTCCG
2927221 AAAAGGACCTGATATGCTTCCCGTAAATTACGGAATCATCACCGGCTCCGTTTGGTGTC
2927281 AGAGGATCTCTTCAATTCGGAGGAAGGACCACTGCATCTGGCCAAGCAGTTGGAACATTT
2927341 CCCGATGGGACCGATGGATCTCCTGTTACCAGCAACCTCGGCGGAAACGTTTCGGCAAA
2927401 CACCGGAAAGAAGCACAGGGATACCTCGATGCATCCGGGCTGGCGGCAAGCGGCCACCT
2927461 CATCAACTTCGTGCGCAGTGTGAGCACACCCACAGCGCATGAGAAGGCCAGAAGCTTAGA
2927521 AGAGCTTCATAGCGTCCAGATGCGGCAACTGTACGACATTGAACCCGACTTCAGAGTGTC
2927581 GTACAGGAATTTGGGCGACCTCTGGAAAGTGATGCTGCACAGGTCTACTGGGGCCCAA
2927641 TTACAAGCGGCTGCTGGAAATCAAGCGGAAGTGGGACCCTGAGGACCTGTTTTCTCTCA
2927701 GCTGGGGGTGGGAAGTGAGGGGTGGACAGAGGACCAAATGTGTAAGAGACAGCAAAGACT
2927761 GCAGCAAATGCTTCAGTATCTAATGTCCAGCATTGCCAGCGGGTATACCGCTAAGTGCA

```

Abb. 6-14: Klonierungsstrategie für das Gen *fgaOx1* von *A. fumigatus* B5233. Der erste Abschnitt des Gens (bis zur blau hervorgehobenen *Bsp*MII-Restriktionsschnittstelle) wurde in einer chemischen Synthese ohne die abgebildeten roten Intron-Sequenzen hergestellt. Der zweite Abschnitt des Gens wurde aus der cDNA-Bibliothek von *A. fumigatus* B5233 amplifiziert. Das Start- und das Stoppcodon des Gens wurden grün hervorgehoben.

6.6 Multi-Proteinsequenzvergleiche

6.6.1 FgaOx1 und EasE

FgaOx1_Af293	MSHRILCVAFVCVSLVAVSSIIYSPFNHPIVYSNNAICFQLSTWRIPQLYLAVLIRRFDL	60
EasE_NCBI	-----	
EasE_Neu	----MYLLGPVACFALIASVLWAPSGRCRCRPWPCWPSAADWHV-----L	43
FgaOx1_Af293	SLSTRGVMLAVTVGVGSSQHHSQRSGLSLTFAMTPSMITLLVKTCVISQRTAVGEPHRPG	120
EasE_NCBI	-----	
EasE_Neu	NDSLQGS�VRIRP-VASVCHGSEYD-----VAACANLSSLVVDSGWRTSNPNT----LQD	93
FgaOx1_Af293	WVWEVGRTEDETHAHS----PRGAPCHQGRIPLYSAAVESVDQIQVAVRFAQRHRLRLV	176
EasE_NCBI	-----MERRQSICPQGRPLYSAVVRSTSDIQASVRFASRHNRLRV	41
EasE_Neu	WVWEIGNGVEEFCPYTTSPMERRQSICPQGRPLYSAVVRSTSDIQASVRFASRHNRLRV	153
	* : * ***:*****. * . * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
FgaOx1_Af293	VRNTGHDTAGRSSGSDSFQIHCHRMKQIEYHDNFRALGSDIDRGPVAVSVGAGVTLGEMYA	236
EasE_NCBI	IKNTGHDSAGRSSAPHSFQIHTSLLQNISLHKNFIARGSTTGRGPAVTLGAGVMQWQAYV	101
EasE_Neu	IKNTGHDSAGRSSAPHSFQIHTSLLQNISLHKNFIARGSTTGRGPAVTLGAGVMQWQAYV	213
	: : * * * * : * * * * . . * * * * : : * . * . * * * * . * * * * : : * .	
FgaOx1_Af293	RGARDGWVVVGECPTVGAAGGFLQGGGVSSFHSFIDGLAVDNVLEFEVVTAKGDVVVAN	296
EasE_NCBI	HGAKNGYITLGGECPTVGAAGGFLQGGGVSSIHSFTRGLAVDQVLEYQVVSANGDLITAN	161
EasE_Neu	HGAKNGYITLGGECPTVGAAGGFLQGGGVSSIHSFTRGLAVDQVLEYQVVSANGDLITAN	273
	: * * : * . : : * * * * * * * . * * * * * * * : * * * : * * : * * : * *	
FgaOx1_Af293	DHQNPDIWFALRGGGGGTFGIVTRATMRVHLNPSVCVSEAVSGLRNNLSLLWTKGITGLF	356
EasE_NCBI	EDNNQDLFWALKGGGGGTFGVVTEATVRVFSDDPVTVTSTKIEAAAANVLFWKEGVHELL	221
EasE_Neu	EDNNQDLFWALKGGGGGTFGVVTEATVRVFSDDPVTVTSTKIEAAAANVLFWKEGVHELL	333
	: . : * : * : * * : * * * * : * . * : * . : * * * : * . : * : * : * :	
FgaOx1_Af293	SILRSFNQQGIPQGIFILRPLSKDQVNASLTLVSLNTDDTRRSAENMLSIRNILESTTLPF	416
EasE_NCBI	RLLQRFNNLHVAGQLVISAPTKDSLQAGLELHFANLTDETQAIQLLRSEARAETHGISA	281
EasE_Neu	RLLQRFNNLHVAGQLVISAPTKDSLQAGLELHFANLTDETQAIQLLRSEARAETHGISA	393
	: * : * : : * * : : * * : : * * : * : * : : * : * : * : * : *	
FgaOx1_Af293	TLASRCLPKISDALRKGPDMPLPVNYGIITGSVLVSEDLFNSEEGPLHLAKLEHFPMPGM	476
EasE_NCBI	STSVRVQRKASSELRMKPDVYPPHYGILEASVLISAATFHANDGPALIASKLSGLTLKPN	341
EasE_Neu	STSVRVQRKASSELRMKPDVYPPHYGILEASVLISAATFHANDGPALIASKLSGLTLKPN	453
	: : * * * * * * * * * : * : * * : * * : * * : * * : * : * : *	
FgaOx1_Af293	DLLFTSNLGGNVSAANTGKKHRDTSMPHGWRAAHLINFVRSVSTPTAHEKARSLEELHSV	536
EasE_NCBI	DILFTSNLGGRVSENT---AIEIALHPAWREAAQLVTLVR-VVEPSIEGKLSALNNLTAR	397
EasE_Neu	DILFTSNLGGRVSENT---AIEIALHPAWREAAQLVTLVR-VVEPSIEGKLSALNNLTAR	509
	* : * * * * * . * * * : : * * : * * : * : * : * : * : * : * : *	
FgaOx1_Af293	QMRQLYDIEPDFRVSYRNLGDPLESDAQVYWGPN-YKRLLEIKRKWDPEDLFFSGLGVG	595
EasE_NCBI	DVPILYSIDPAAKISYRNLGDPQEKEFQTRYWGADNYARLAATKAAWDPShLFMTSLGVG	457
EasE_Neu	DVPILYSIDPAAKISYRNLGDPQEKEFQTRYWGADNYARLAATKAAWDPShLFMTSLGVG	569
	: : * * : * : : * * * * * : : * * : * * : * * : * * : * * : * *	
FgaOx1_Af293	SEGWTEQDMCKRQRLQQLQYLMSSIAQRVYR	628
EasE_NCBI	SEVWDAEGICRKRGRFRAKASSLIGM-----	483
EasE_Neu	SEVWDAEGICRKRGRFRAKASSLIGM-----	595
	** * : : * * : : : * . * :	

Abb. 6-15: Multi-Proteinsequenzvergleiche von FgaOx1 aus *A. fumigatus* Af293 mit EasE aus *C. purpurea* P1 nach dem NCBI-Datenbankeintrag und der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Proteinsequenz von EasE.

6.7 Primärsequenzanalyse von FtmO

MGRWWGLPLPPEITILELFEYLRPPDVVALAQAAEGFAQLALSVYSSSLREKGQTILFSAV	60
TCGHVSIVRHYLEQGADPCAADDEGYTPLHWAAAYGHYNVVSLLIDVGADINARQNSGFS	120
<u>PLDYAIITGHDRVVEVLLKHGATITDVTIGPSQRTTLHAAAIKGYSKI</u> AKMLLSHGAPTD	180
<u>VKDAHGHTPLHLAVSKGHLEIVQALLCAGATVDIQDKVGDSPLHLAAGNGYFAIVQELN</u>	240
<u>KGADPSLQGRKTATPLHQASLMGFVDVVQLLLESGANVSAQRSDGQTPLLQASGAGQVAT</u>	300
<u>VRLLLGAGSSPSIPDEDGNTPLHFAVLSEKATIAEMLIEAGAHVDSANDKNQTPHWA</u> AK	360
<u>GHEEMVPTLLKHKADTHARSHTGWTPLHWAANEGHVGITALLDAGARDQIQNEHGESAL</u>	420
<u>HLAVQKGHQAVVQLLIQRGSKPHLTDNKLRTVLHCAADVGHEDVVRILLSVQARSDVKDI</u>	480
<u>NGRTPLYAALQGHVVIKLLLEFGTALDESVKEAFLEAAEAGHELMVQLLITHGIDLSF</u>	540
<u>KDTSGSTALHRAVLGGQIEVVELLLDTEADTSARDNSGKTALHLAAQEGEDEIAKVLLRH</u>	600
<u>SEIRDLQDCDGWTALHWAVNNEHENTVQSLLDAGVDPGIASFDACTPLDLAEVGALETIE</u>	660
QMLREALAATDRPTIGDAPP	680

Abb. 6-18: Primärsequenz von FtmO. Die *Ankyrin repeats* wurden unterstrichen.

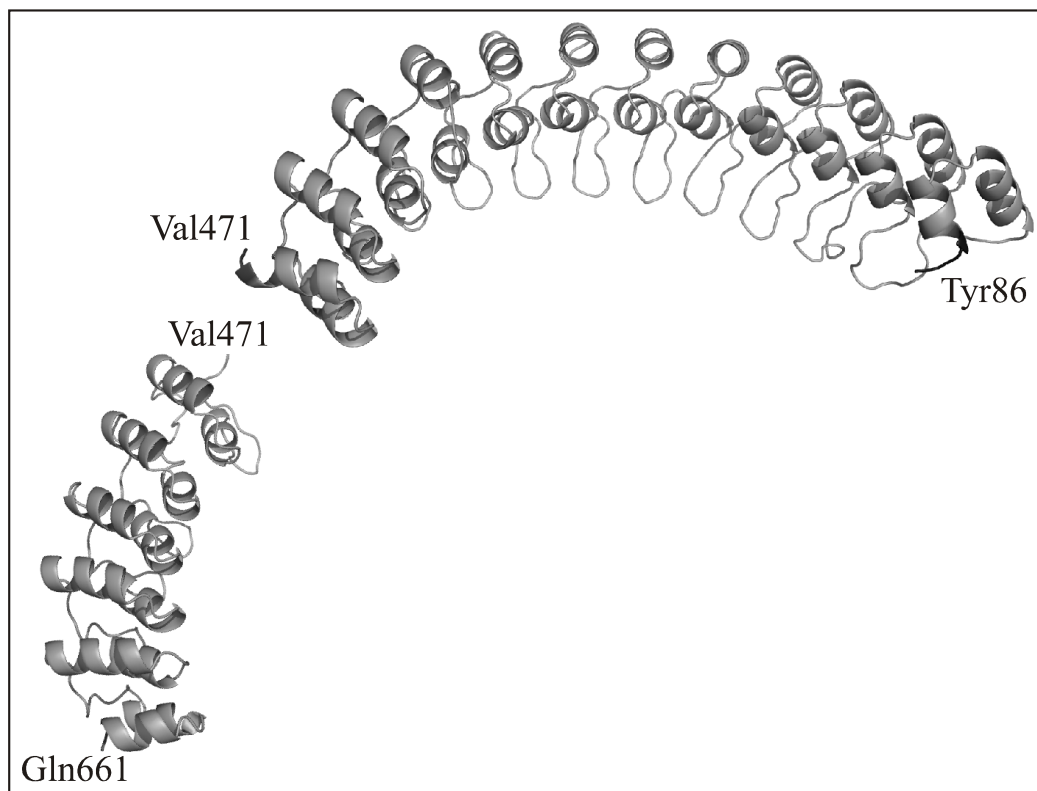


Abb. 6-19: Sekundärstruktur-Vorhersage für das Protein FtmO. Die *Ankyrin repeats* wurden in der Cartoon-Darstellung abgebildet.

6.8 NMR-Spektren von Agroclavin

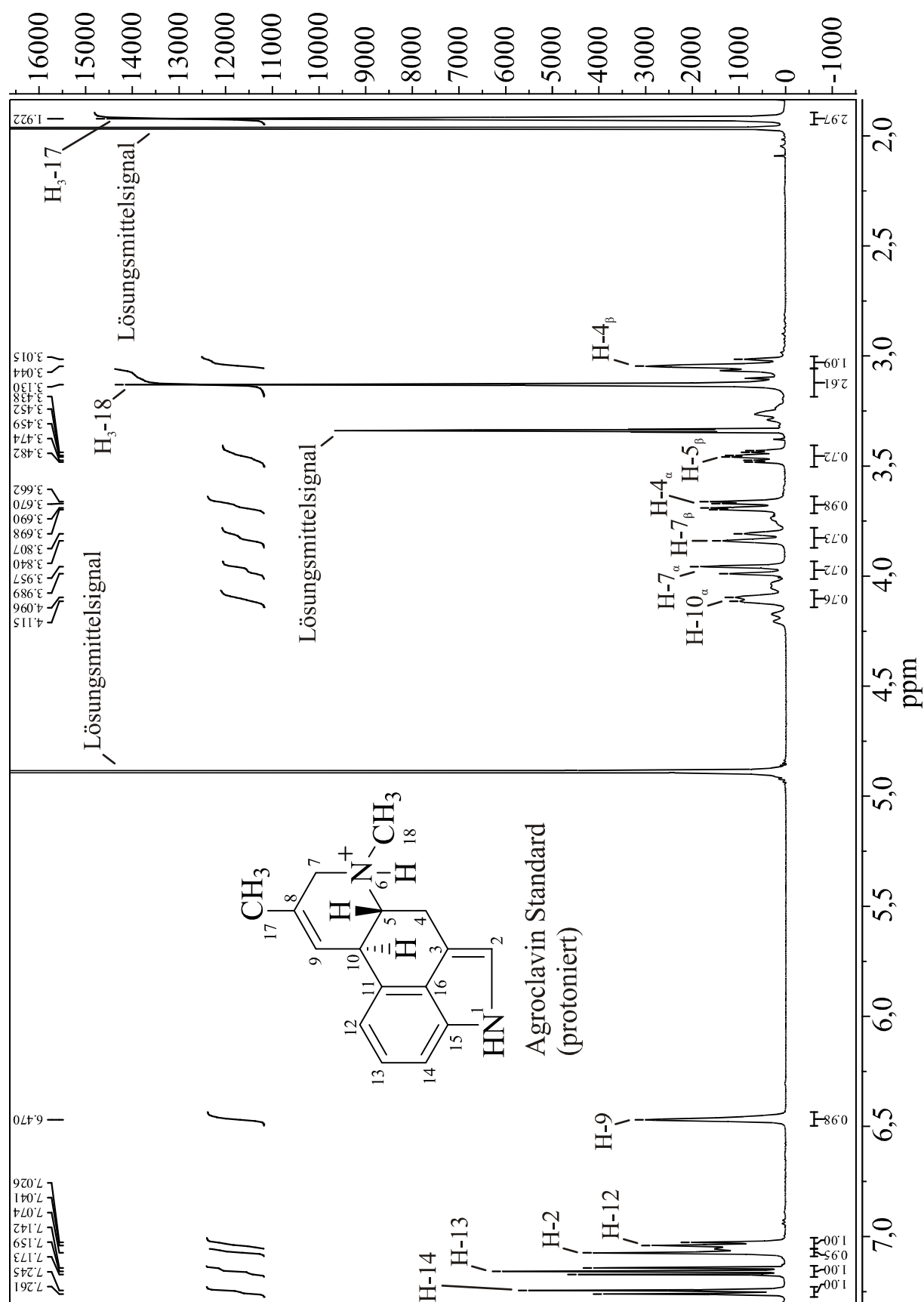


Abb. 6-20: ¹H-NMR-Übersichtsspektrum des authentischen Agroclavin-Standards in der protonierten Form aufgenommen in CD₃OD.

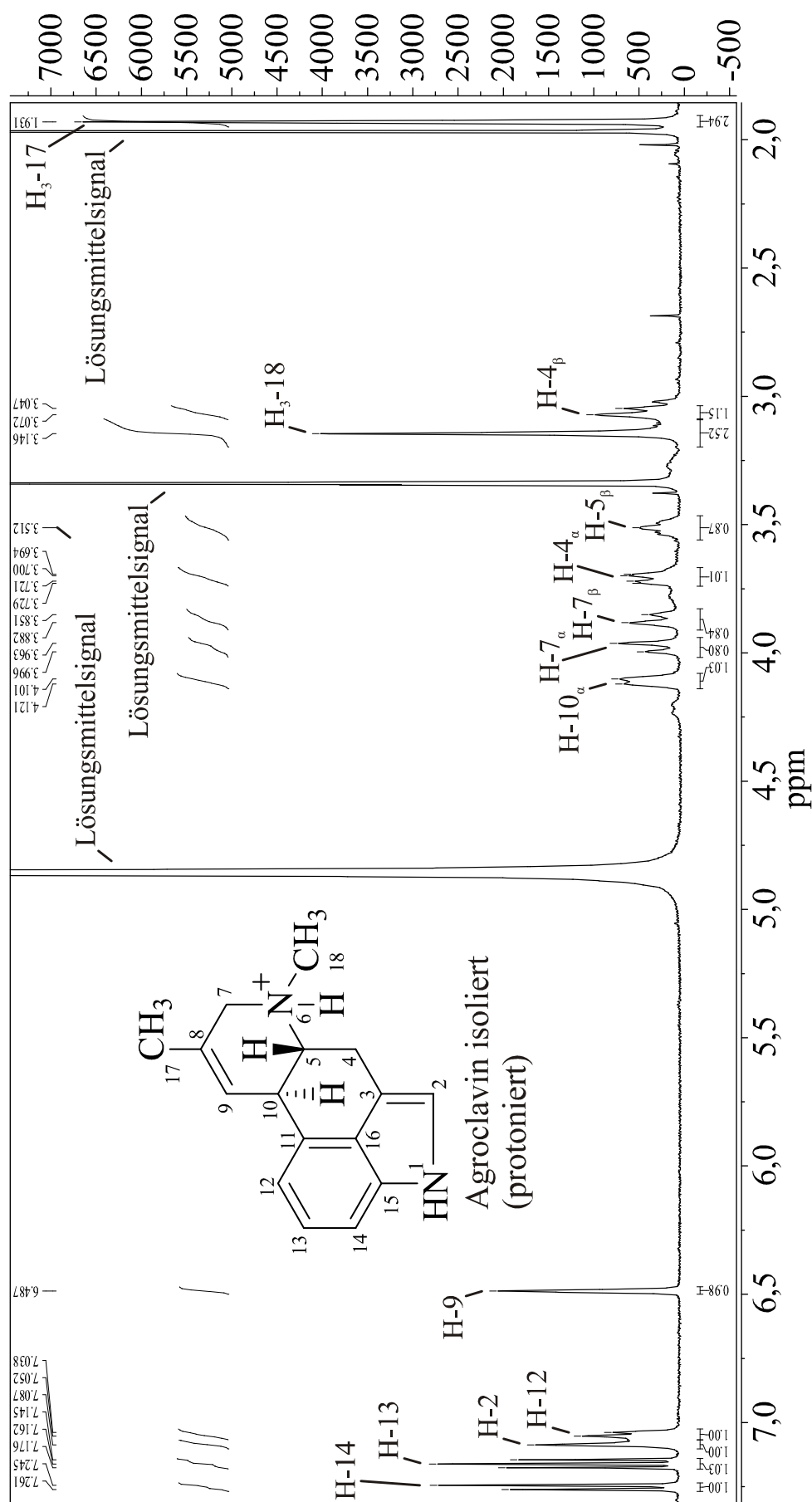


Abb. 6-21: ¹H-NMR-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von EasG in der protonierten Form aufgenommen in CD₃OD.

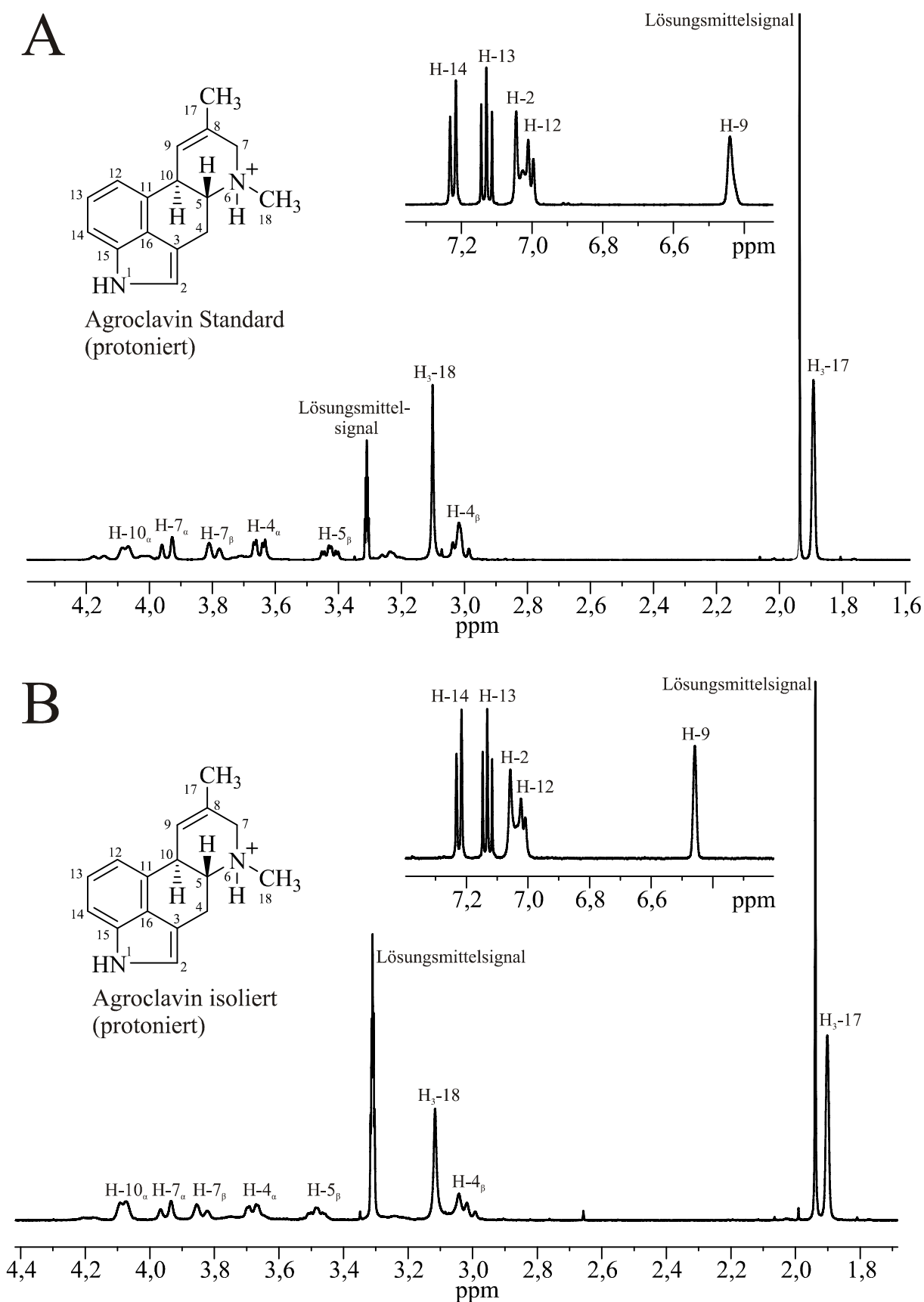


Abb. 6-22: Vergleich der Vergrößerungen des ^1H -NMR-Spektrums des authentischen Agroclavin-Standards (A) in der protonierten Form aufgenommen in CD_3OD , mit der des ^1H -NMR-Spektrums (B) des protonierten enzymatischen Produkts von EasG in CD_3OD .

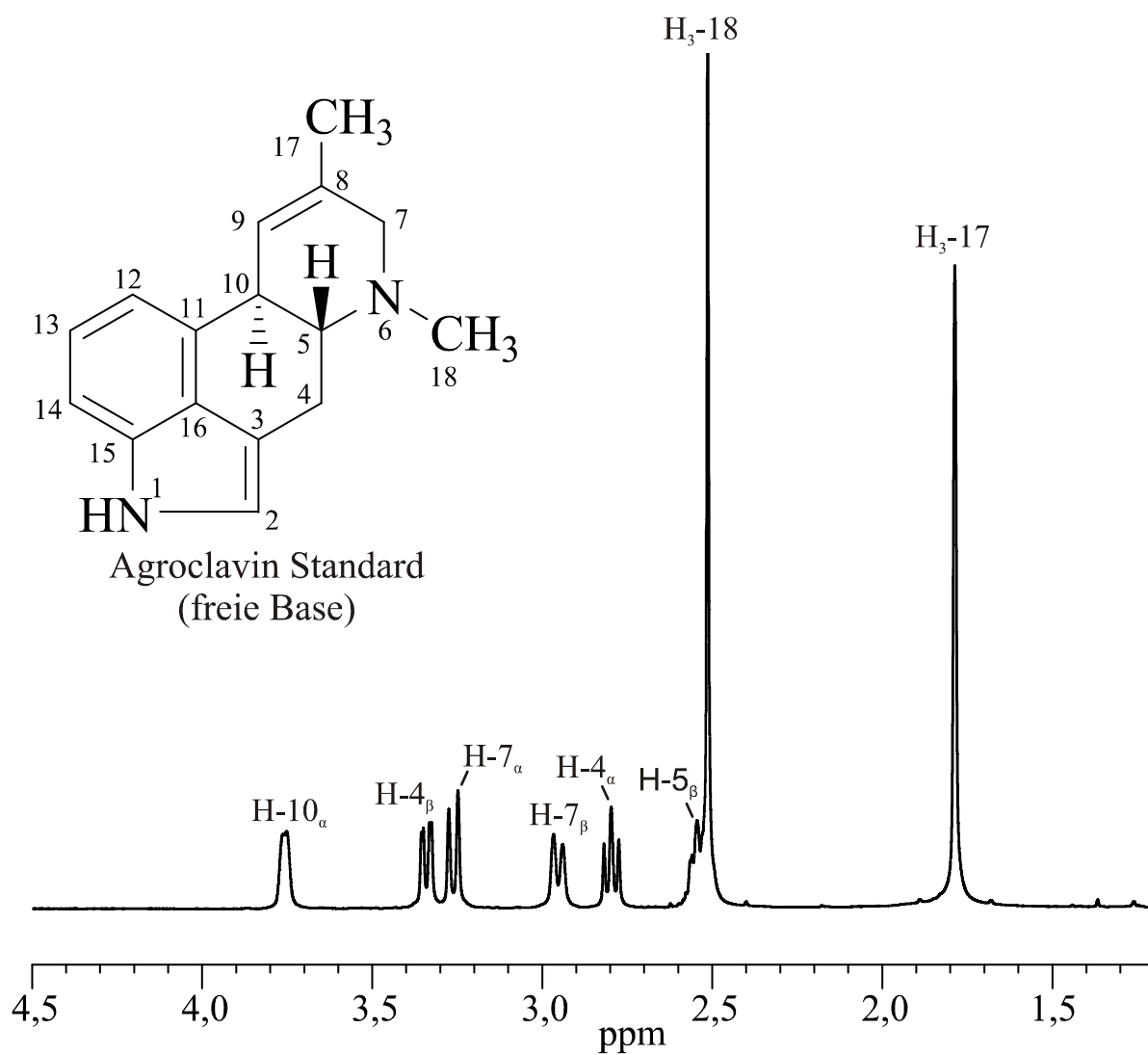
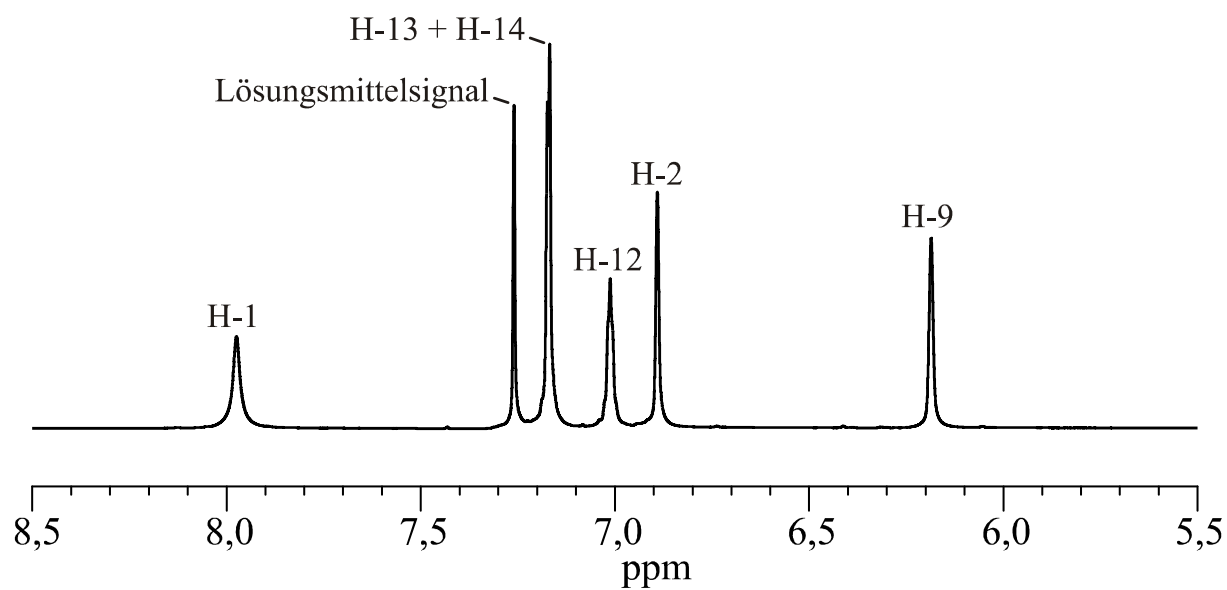


Abb. 6-23: Vergrößerung des ¹H-NMR-Spektrums des authentischen Agrocavin-Standards als freie Base in CDCl₃.

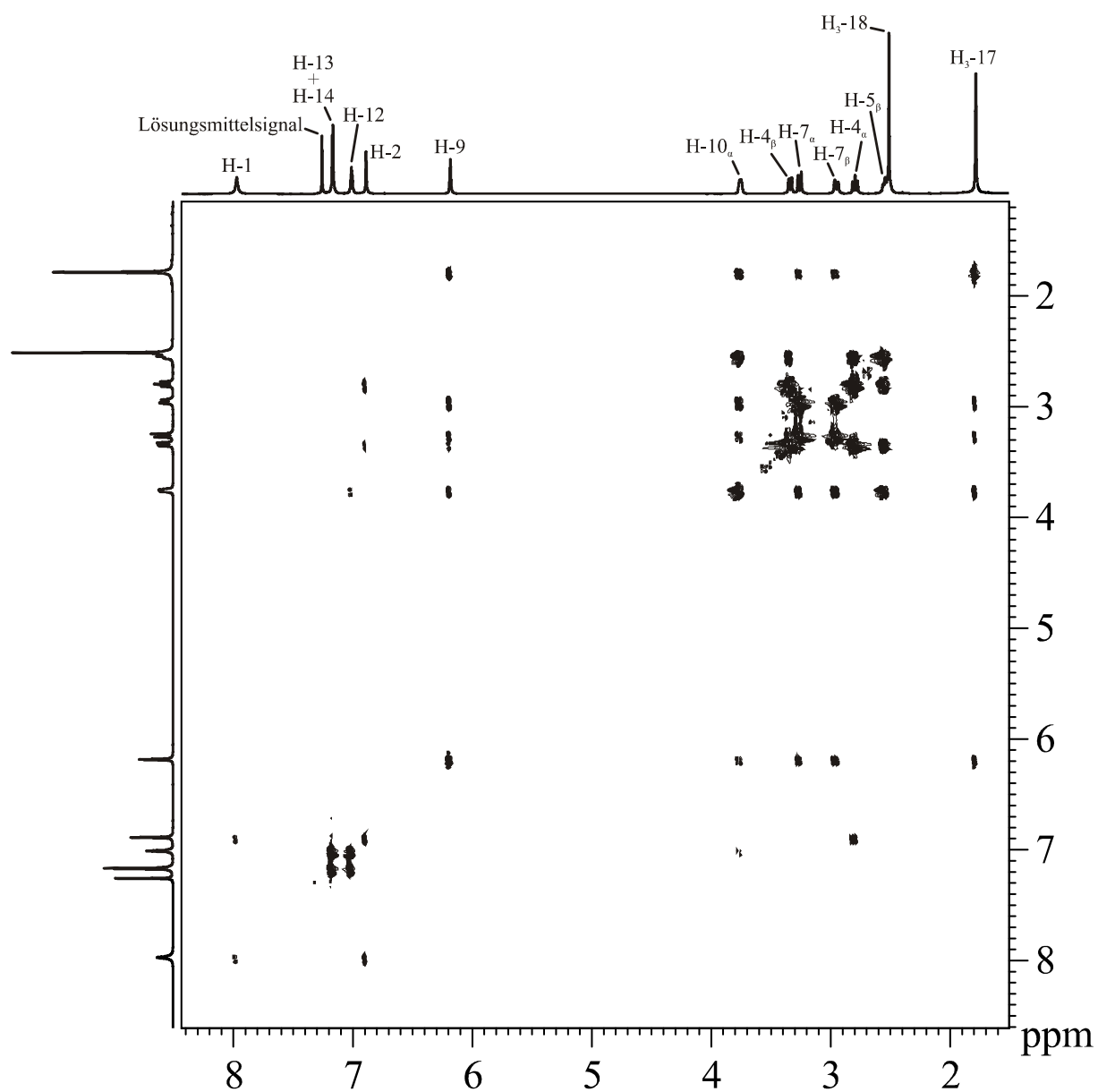


Abb. 6-24: DQF-COSY-Übersichtsspektrum des authentischen Agroclavin-Standards als freie Base in CDCl_3 .

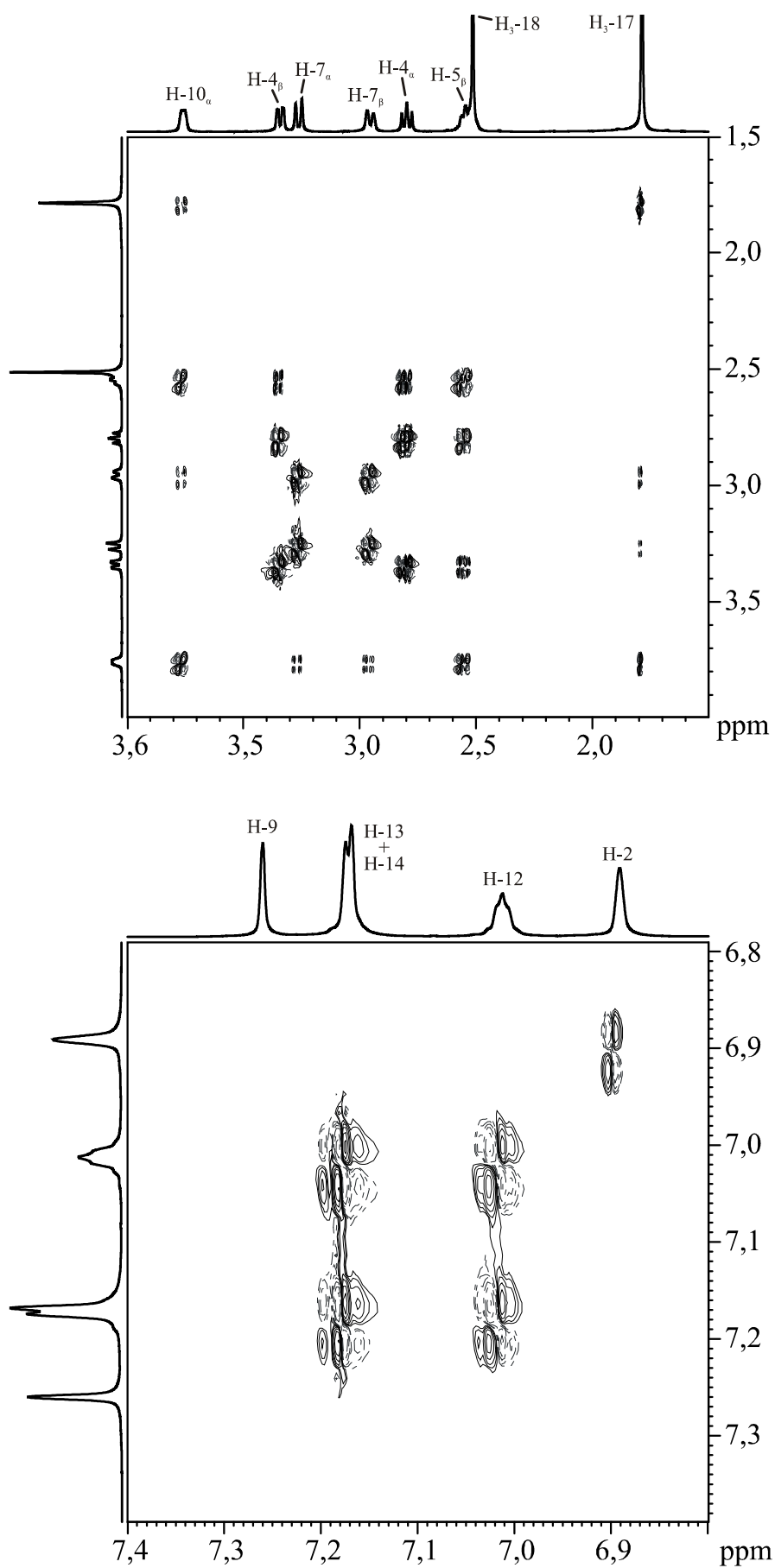


Abb. 6-25: Vergrößerungen des DQF-COSY-Spektrums des authentischen Agroclovain-Standards als freie Base in CDCl₃.

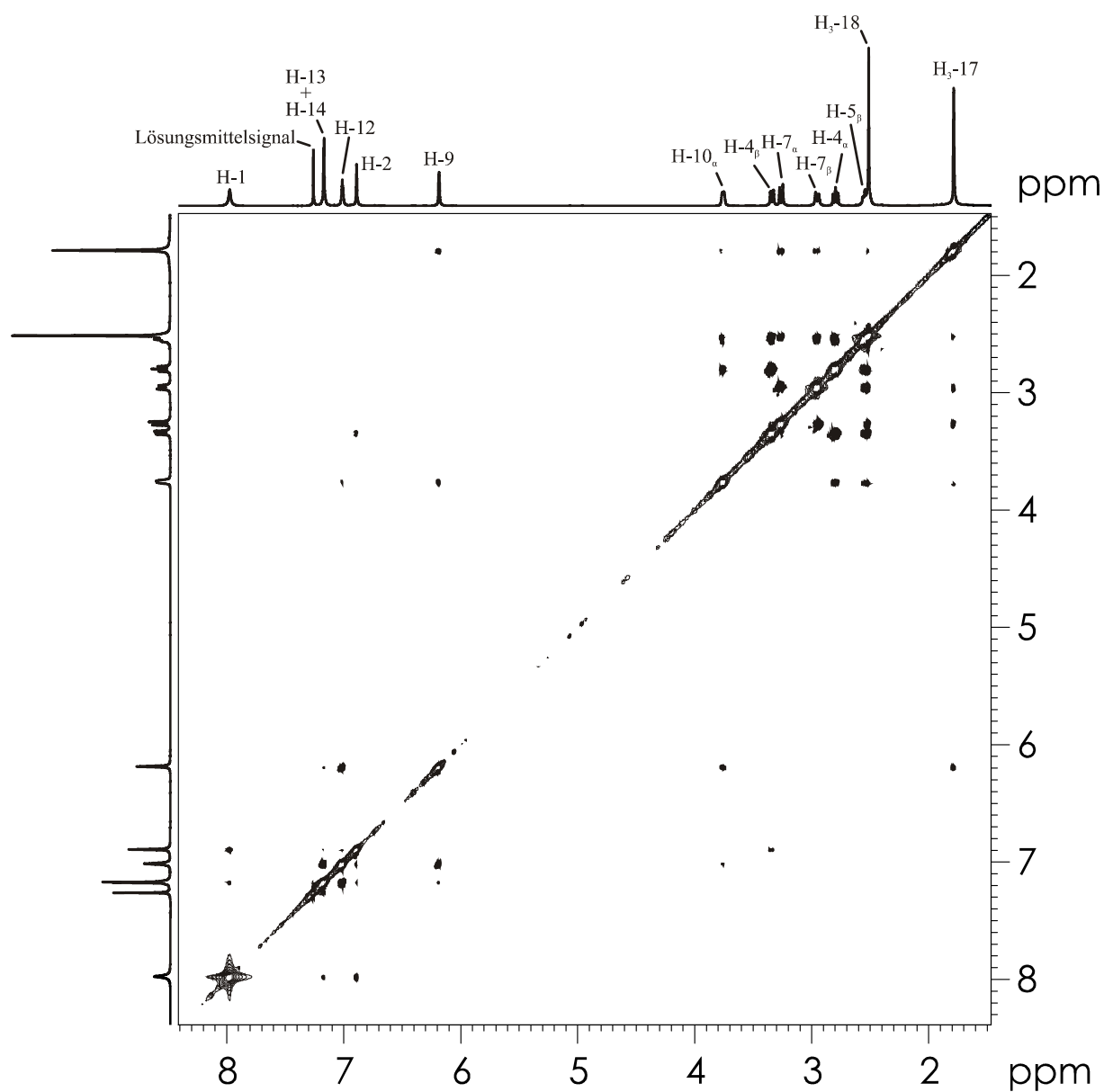


Abb. 6-26: ROESY-Übersichtsspektrum des authentischen Agroclavin-Standards als freie Base in CDCl_3 .

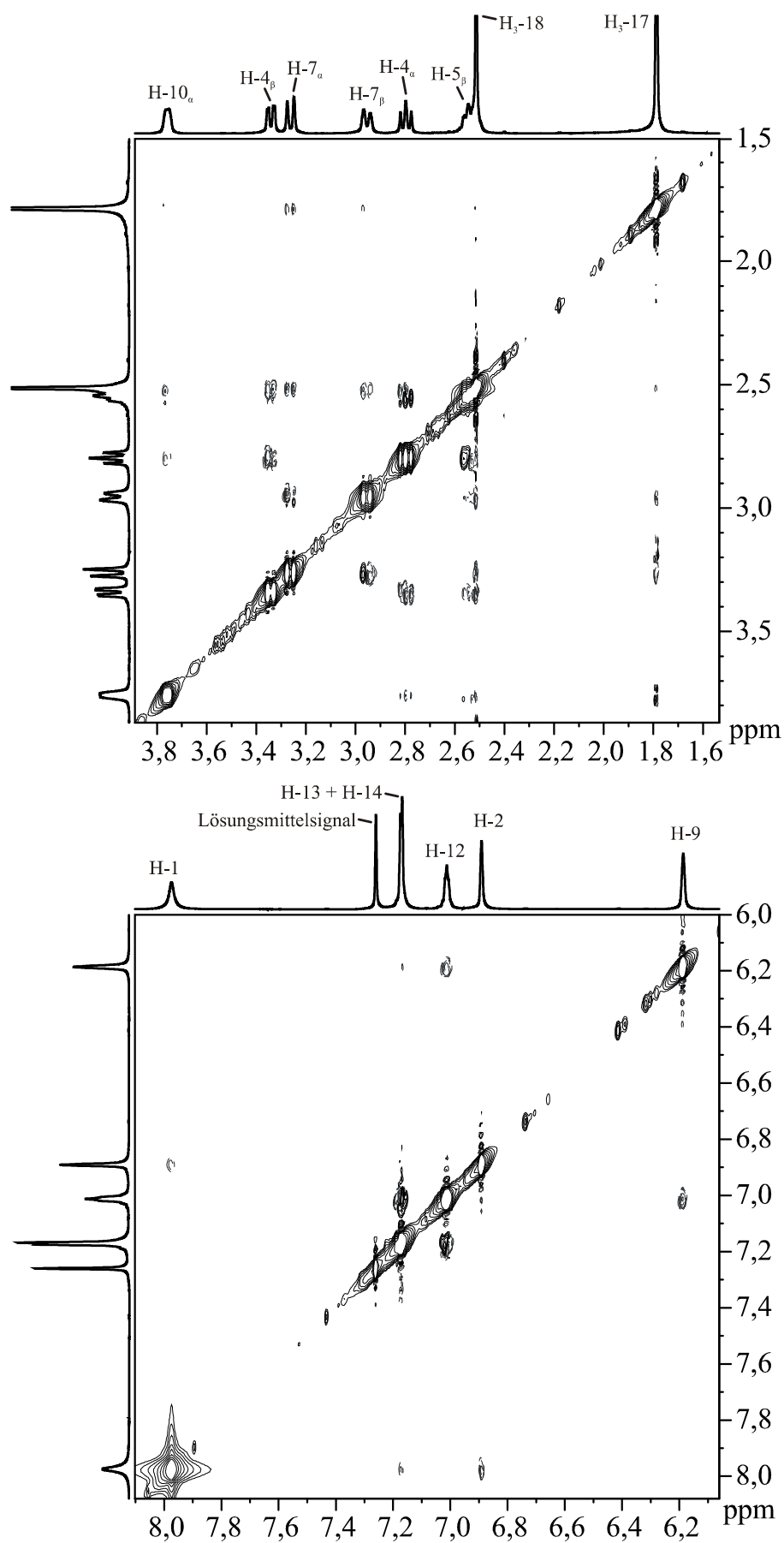


Abb. 6-27: Vergrößerungen des ROESY-Spektrums des authentischen Agroclavin-Standards als freie Base in CDCl₃.

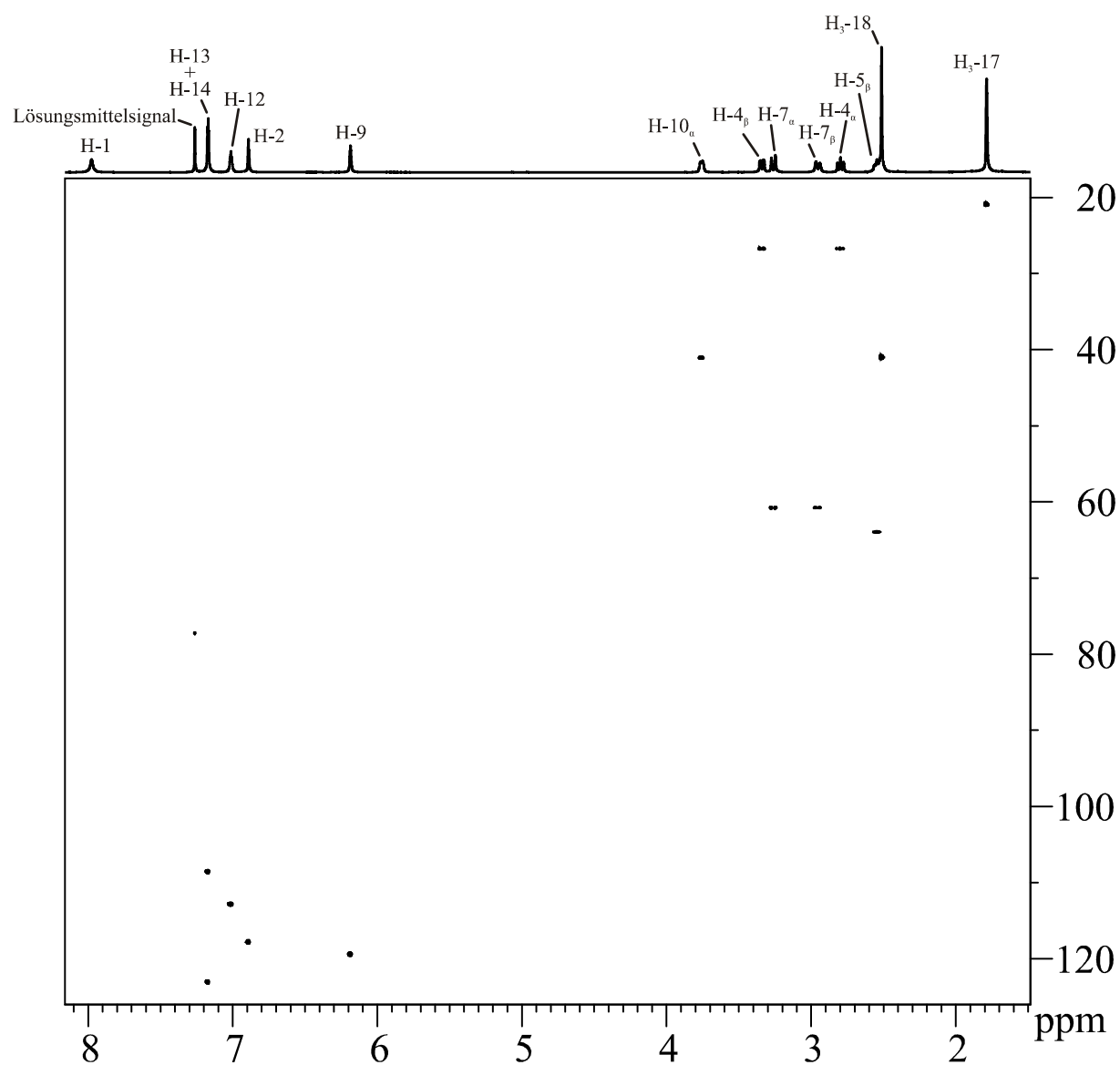


Abb. 6-28: HSQC-Übersichtsspektrum des authentischen Agroclavin-Standards als freie Base in CDCl₃.

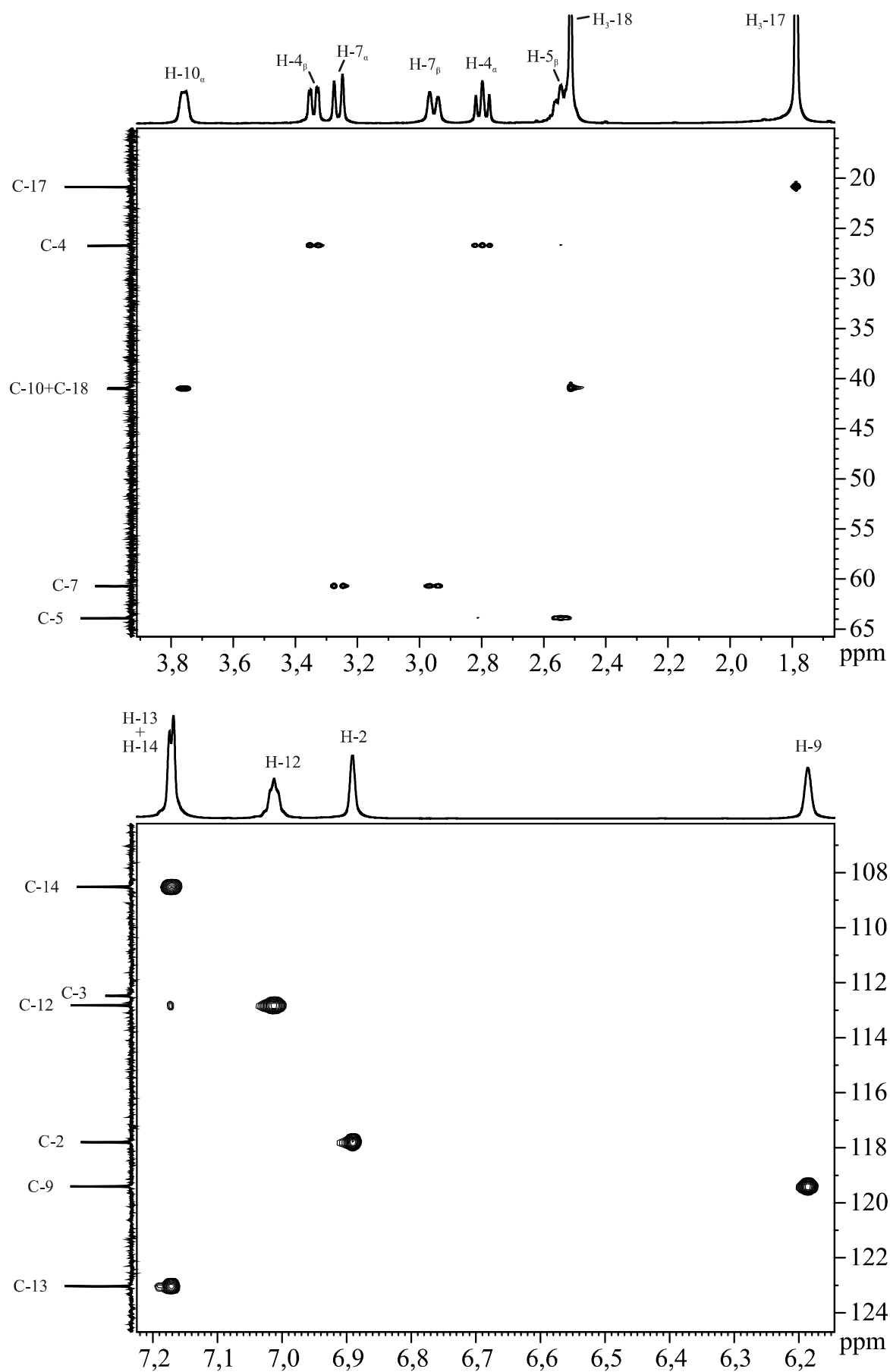


Abb. 6-29: Vergrößerungen des HSQC-Spektrums des authentischen Agroclovain-Standards als freie Base in CDCl₃.

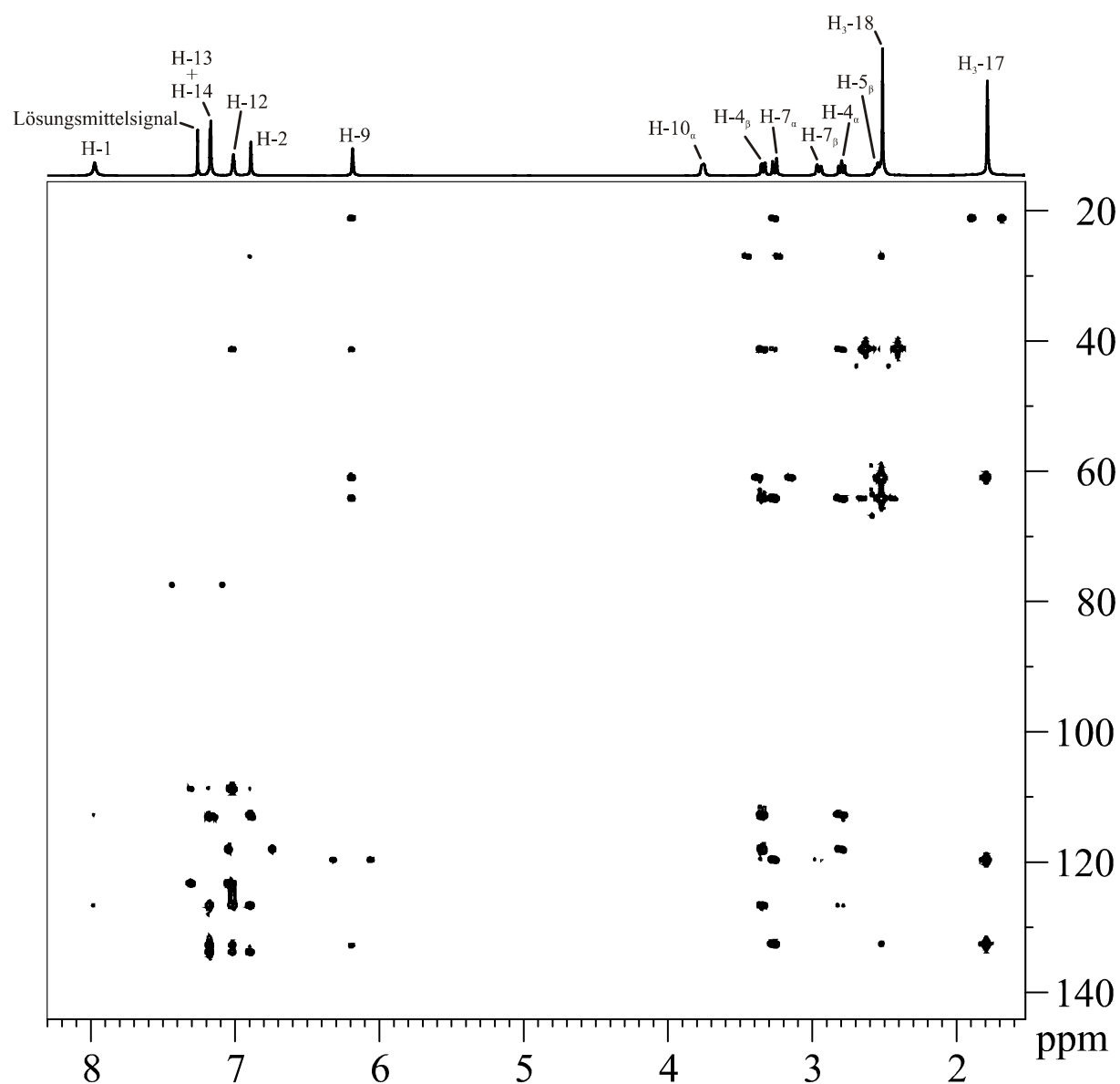


Abb. 6-30: HMBC-Übersichtsspektrum des authentischen Agrocavin-Standards als freie Base in CDCl₃.

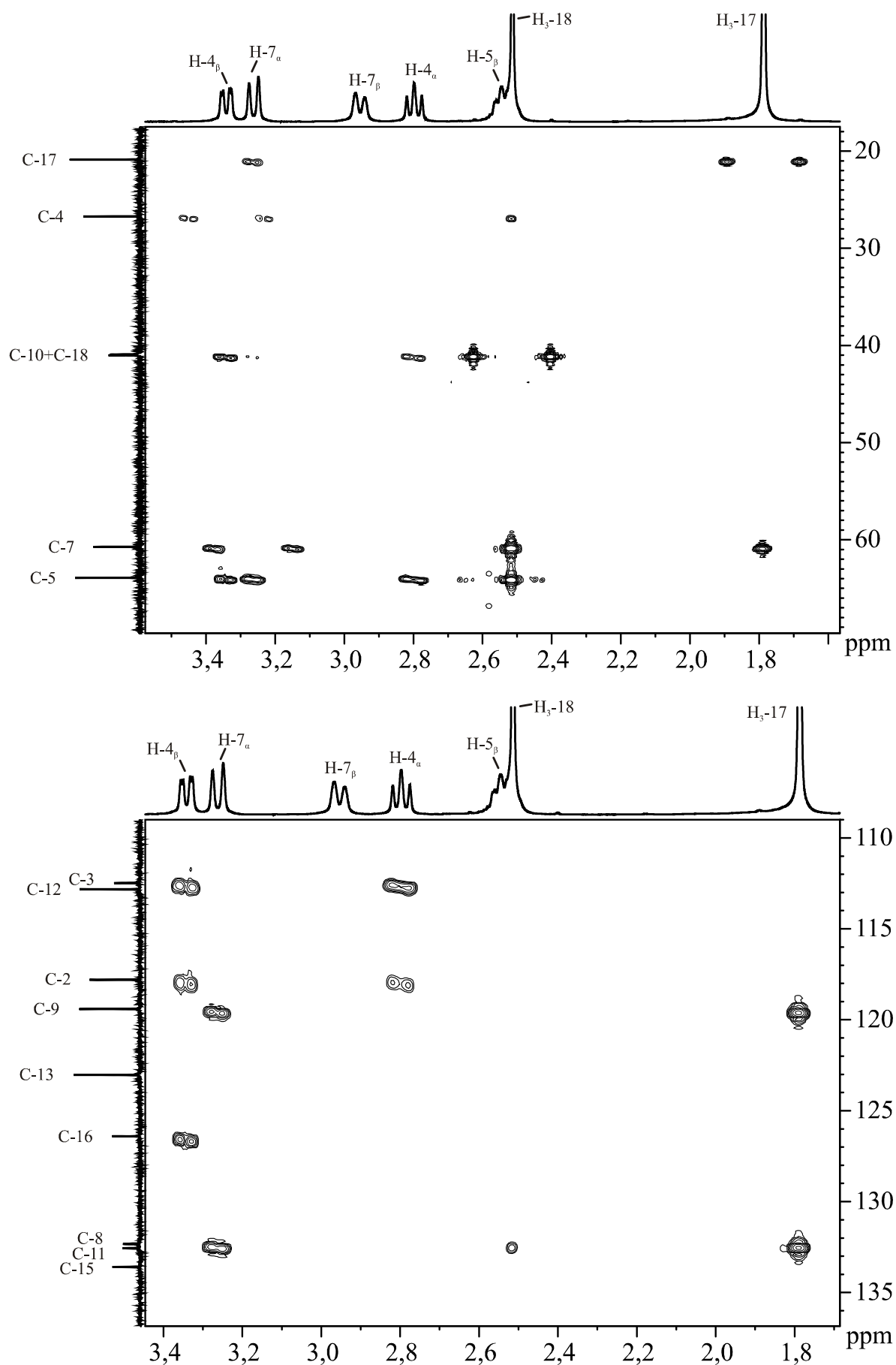


Abb. 6-31: Vergrößerungen des aliphatischen Bereichs des HMBC-Spektrums des authentischen Agrocloavin-Standards als freie Base in CDCl₃.

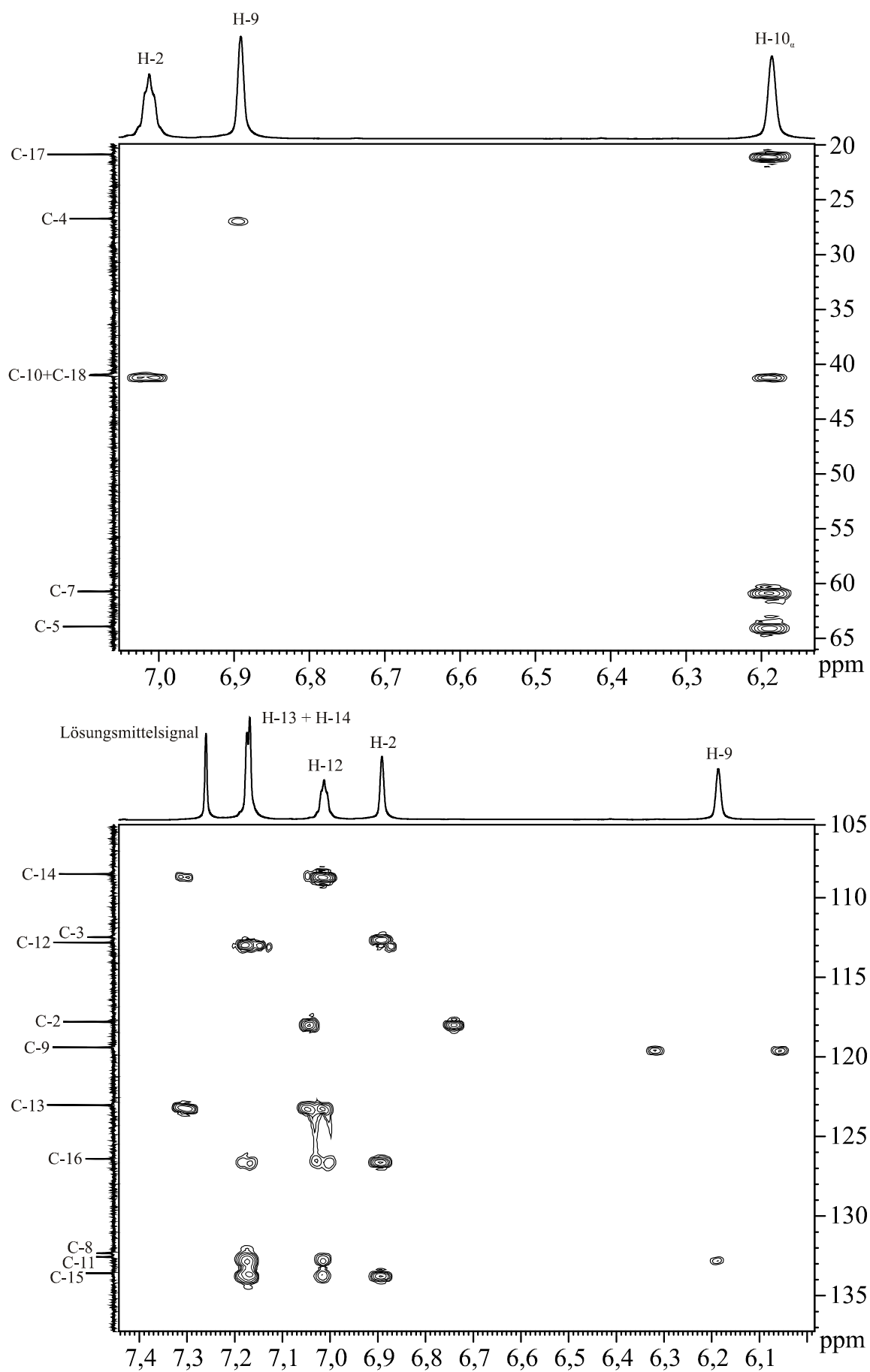


Abb. 6-32: Vergrößerungen des aromatischen Bereichs des HMBC-Spektrums des authentischen Agroclavin-Standards als freie Base in CDCl₃.

Tab. 6-1: ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten des Agroclavin-Standards in deprotonierter Form aufgenommen in CDCl_3 . Die NMR-Daten wurden mit den Literaturdaten von Flieger *et al.* und Ninomiya *et al.* verglichen (Flieger *et al.*, 1991; Ninomiya *et al.*, 1991).

Eigene Daten des Agroclavin-Standards			Literaturdaten von Agroclavin		
Position	δ_{C}	δ_{H} , multi., J in Hz	Position	δ_{C}	δ_{H} , multi., J in Hz
1	-	7,98, s	1	-	7,98, s
2	117,77	6,89, s	2	117,85	6,94, s
3	112,47	-	3	112,16	-
4 $_{\alpha}$	26,73	2,80, t, 13,0	4 $_{\alpha}$	26,69	2,80, ddd, 14, 12, 1,5
4 $_{\beta}$		3,34, dd, 10,1, 4,6	4 $_{\beta}$		3,34, dd, 14
5 $_{\beta}$	63,92	2,55, m	5 $_{\beta}$	63,85	2,56, ddd, 12, 9
7 $_{\alpha}$	60,71	3,26, d, 16,1	7 $_{\alpha}$	60,63	3,26, d, 15
7 $_{\beta}$		2,95, d, 16,0	7 $_{\beta}$		2,96, d, 15
8	132,32	-	8	132,25	-
9	119,34	6,19, s	9	119,41	6,20, s
10 $_{\alpha}$	41,01	3,76, d, 6,7	10 $_{\alpha}$	40,95	3,76, d, 18
11	132,58	-	11	132,42	-
12	112,83	7,01, m	12	112,62	7,03, m
13	122,97	7,17, m	13	122,84	7,20, m
14	108,37	7,17, m	14	108,51	7,20, m
15	133,58	-	15	133,54	-
16	126,42	-	16	126,33	-
17	20,78	1,79, s	17	20,83	1,79, s
18	40,91	2,51, s	18	40,85	2,52, s

6.9 ESI-MS-Spektren des isolierten Agroclavins und des Chanoclavin-I-Aldehyd-DTT Intermediats

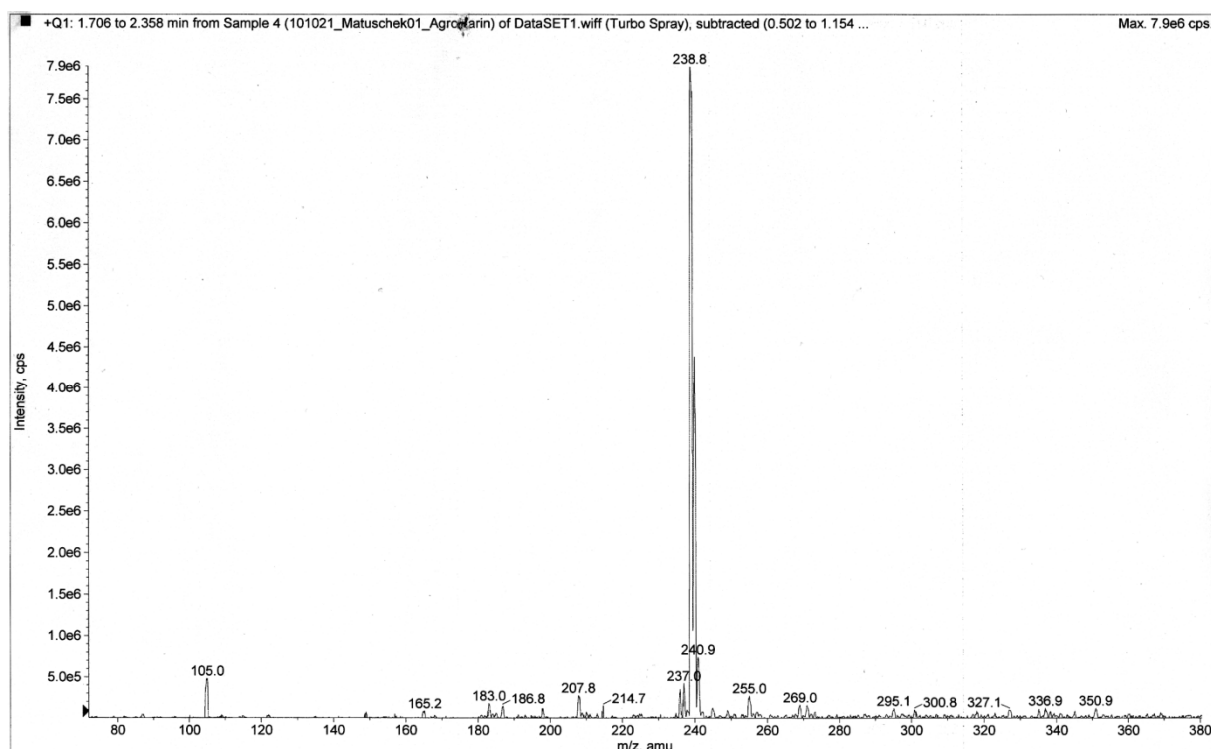


Abb. 6-33: Positives ESI-MS-Spektrum des isolierten Agroclavins, theoretische Masse $[M+1]^+$:239,2.

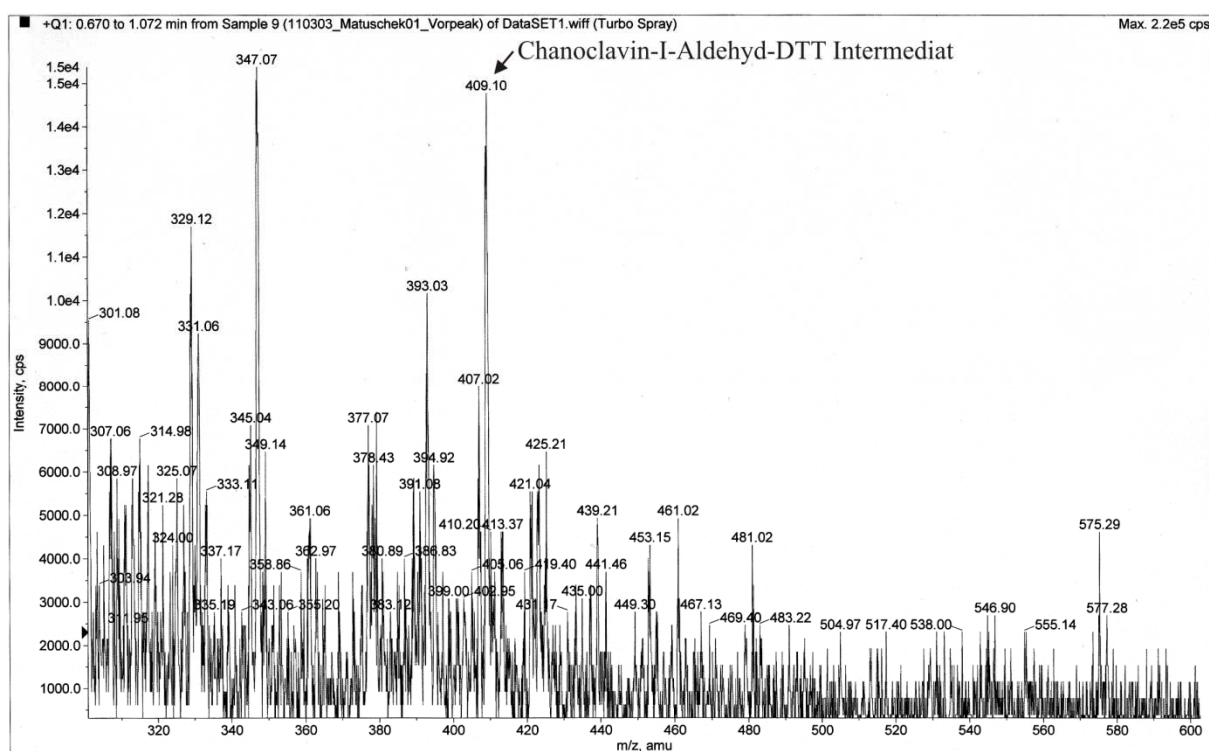


Abb. 6-34: Positives ESI-MS-Spektrum des isolierten Chanoclavin-I-Aldehyd-DTT Intermediats, theoretische Masse $[M+1]^+$:409,2.

6.10 NMR-Spektren des isolierten Pyroclavins

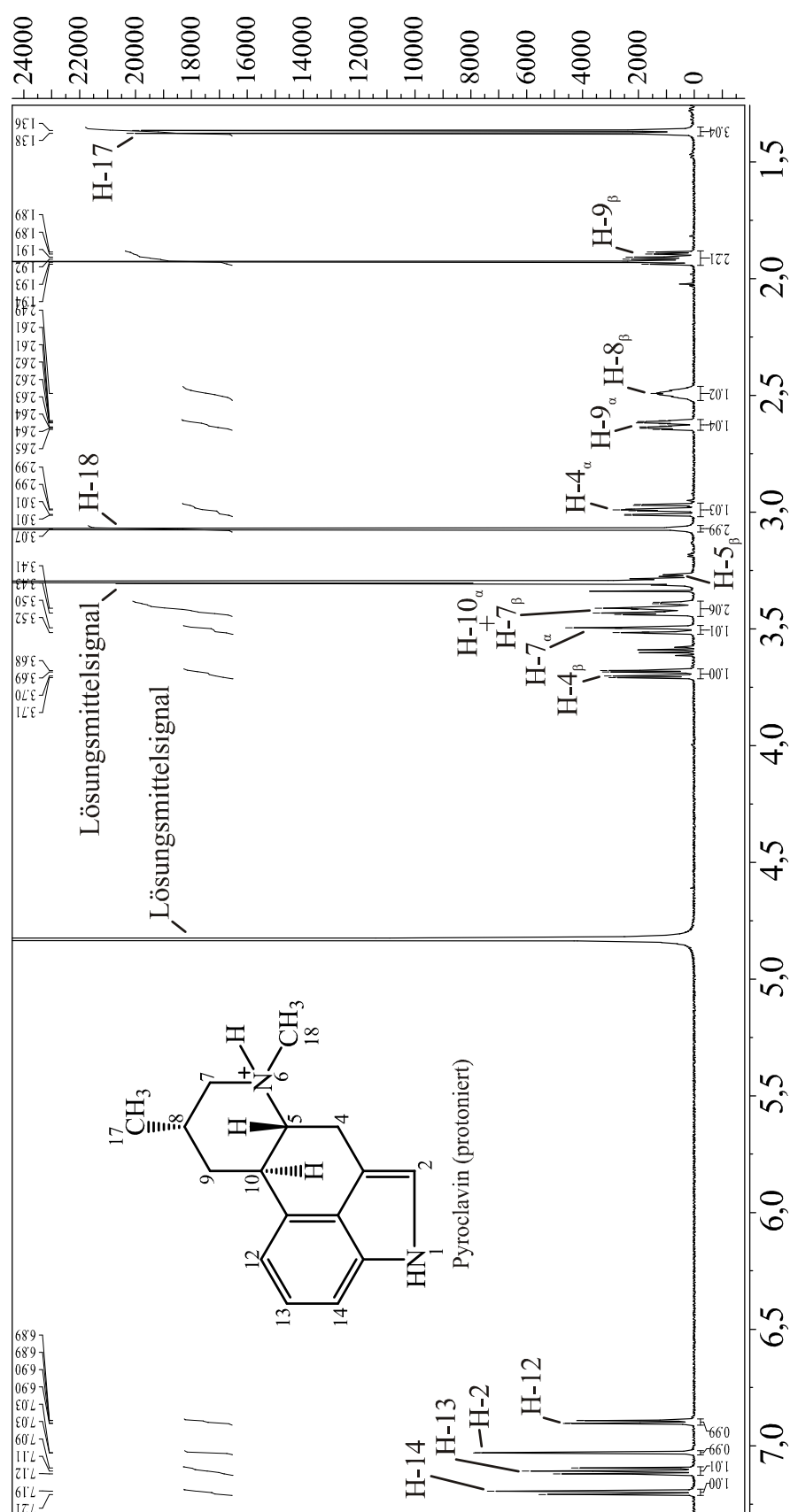


Abb. 6-35: ^1H -NMR-Übersichtsspektrum des Pyroclavins in protonierter Form aufgenommen in CD_3OD .

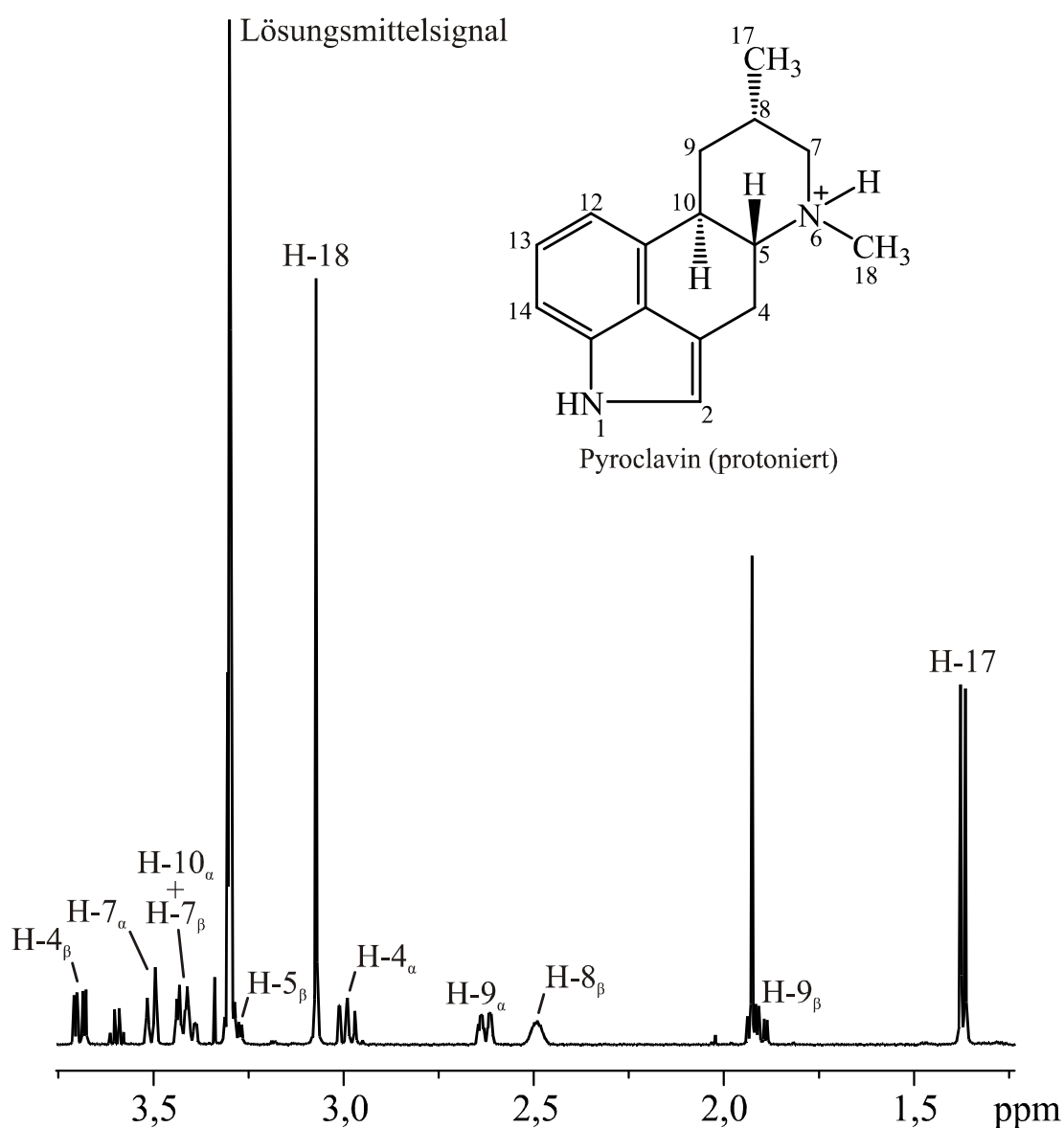
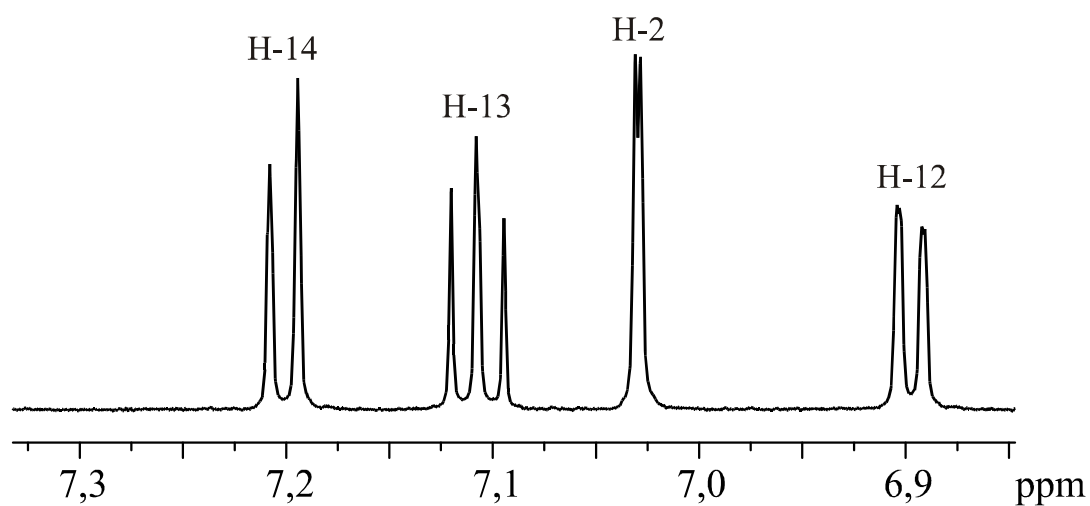


Abb. 6-36: Vergrößerungen des ¹H-NMR-Spektrums des Pyroclavins in protonierter Form aufgenommen in CD₃OD.

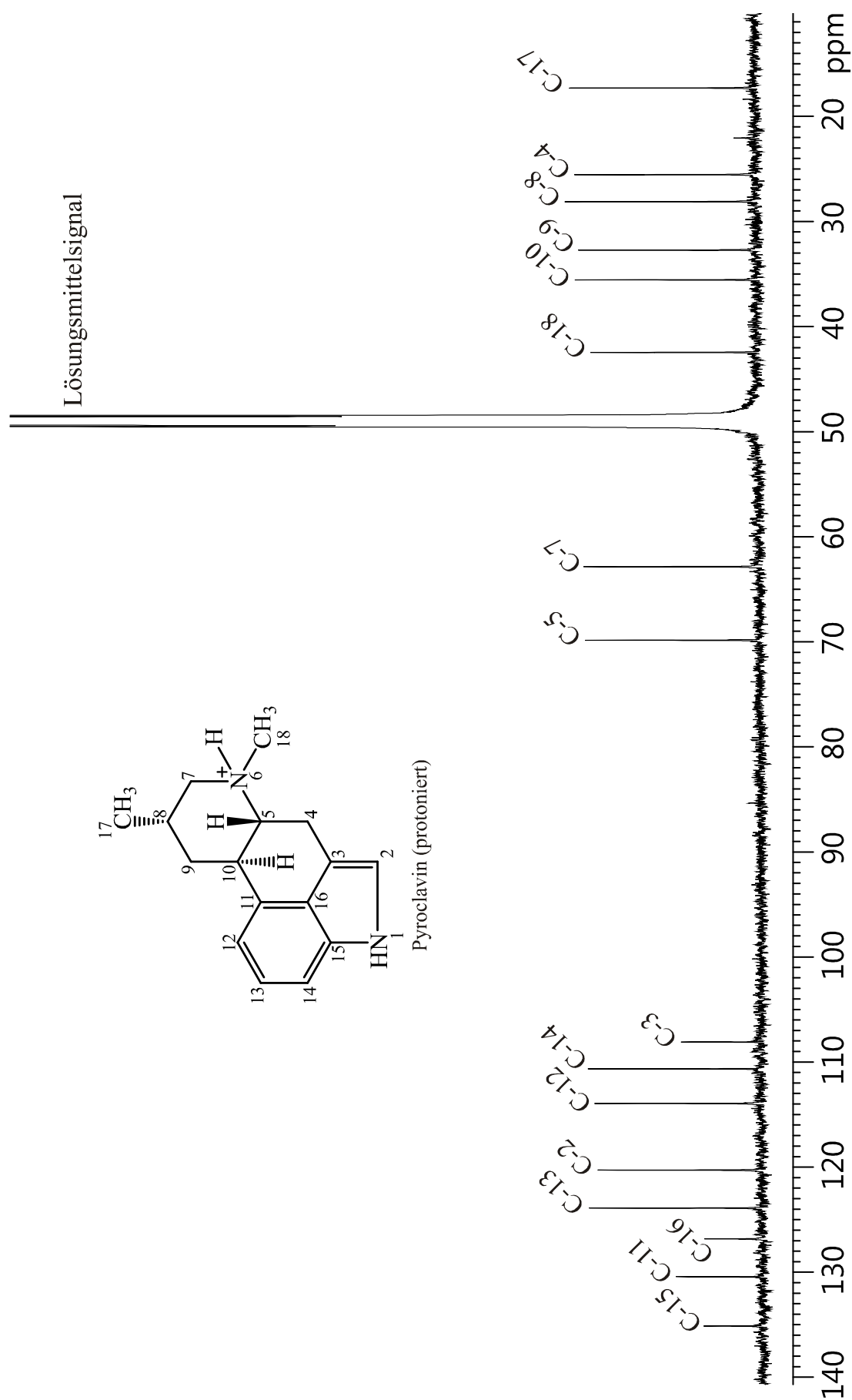


Abb. 6-37: ^{13}C -NMR-Übersichtsspektrum des Pyroclavins in protonierter Form aufgenommen in CD_3OD .

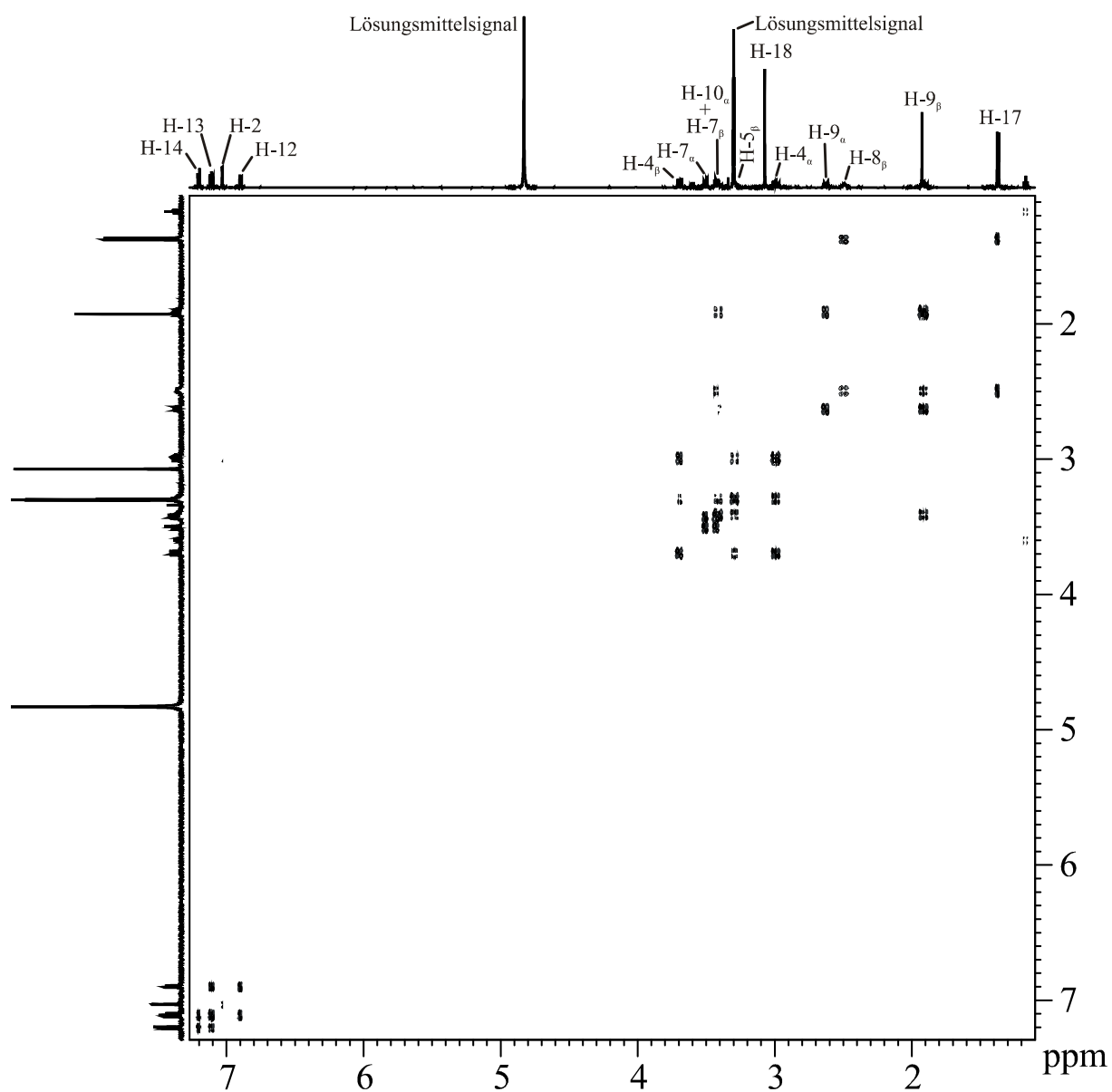


Abb. 6-38: DQF-COSY-Übersichtsspektrum des Pyroclavins in protonierter Form aufgenommen in CD_3OD .

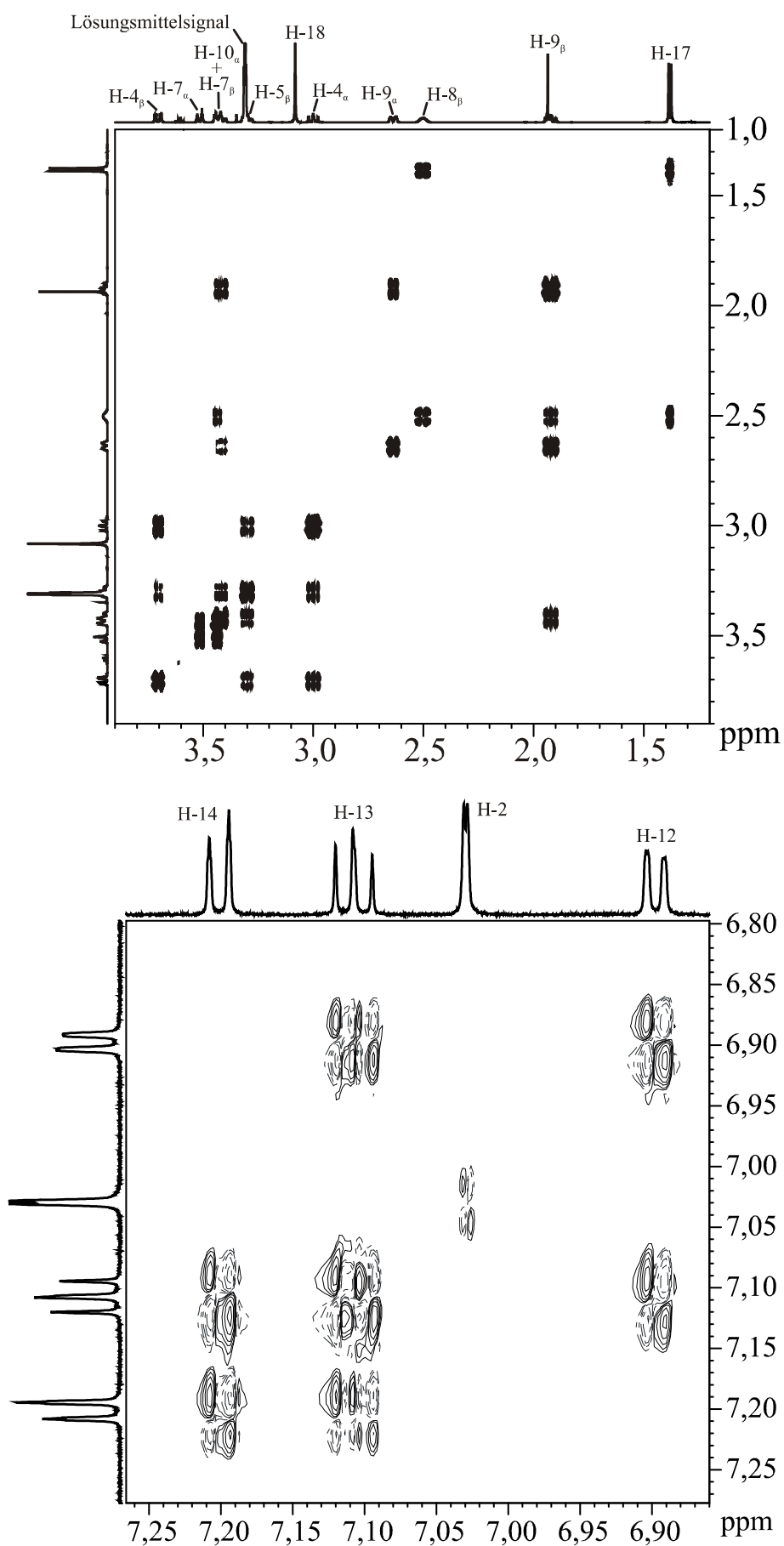


Abb. 6-39: Vergrößerungen des DQF-COSY-Spektrums des Pyroclavins in protonierter Form aufgenommen in CD₃OD.

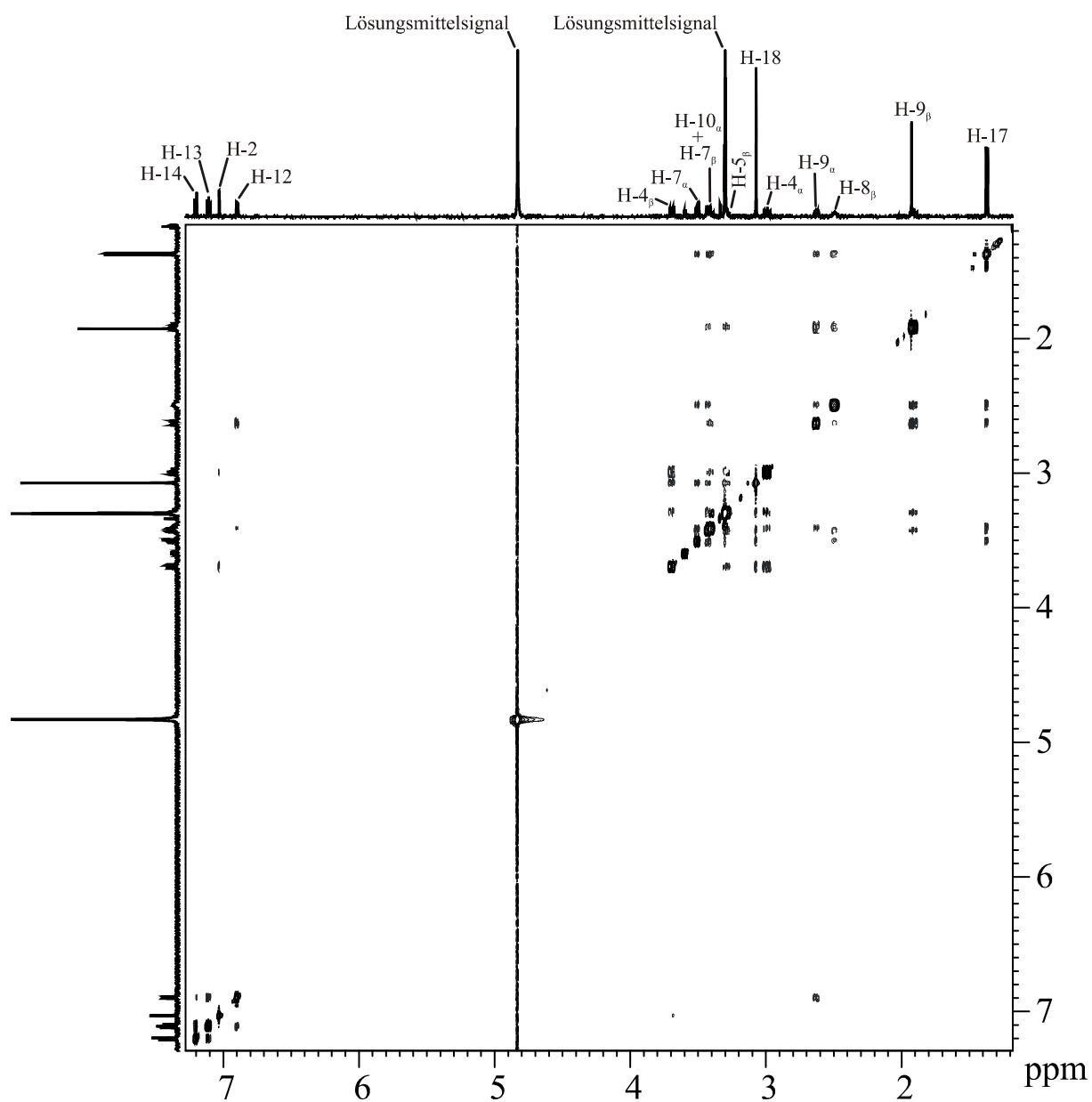


Abb. 6-40: NOESY-Spektrum des Pyroclavins in protonierter Form aufgenommen in CD₃OD.

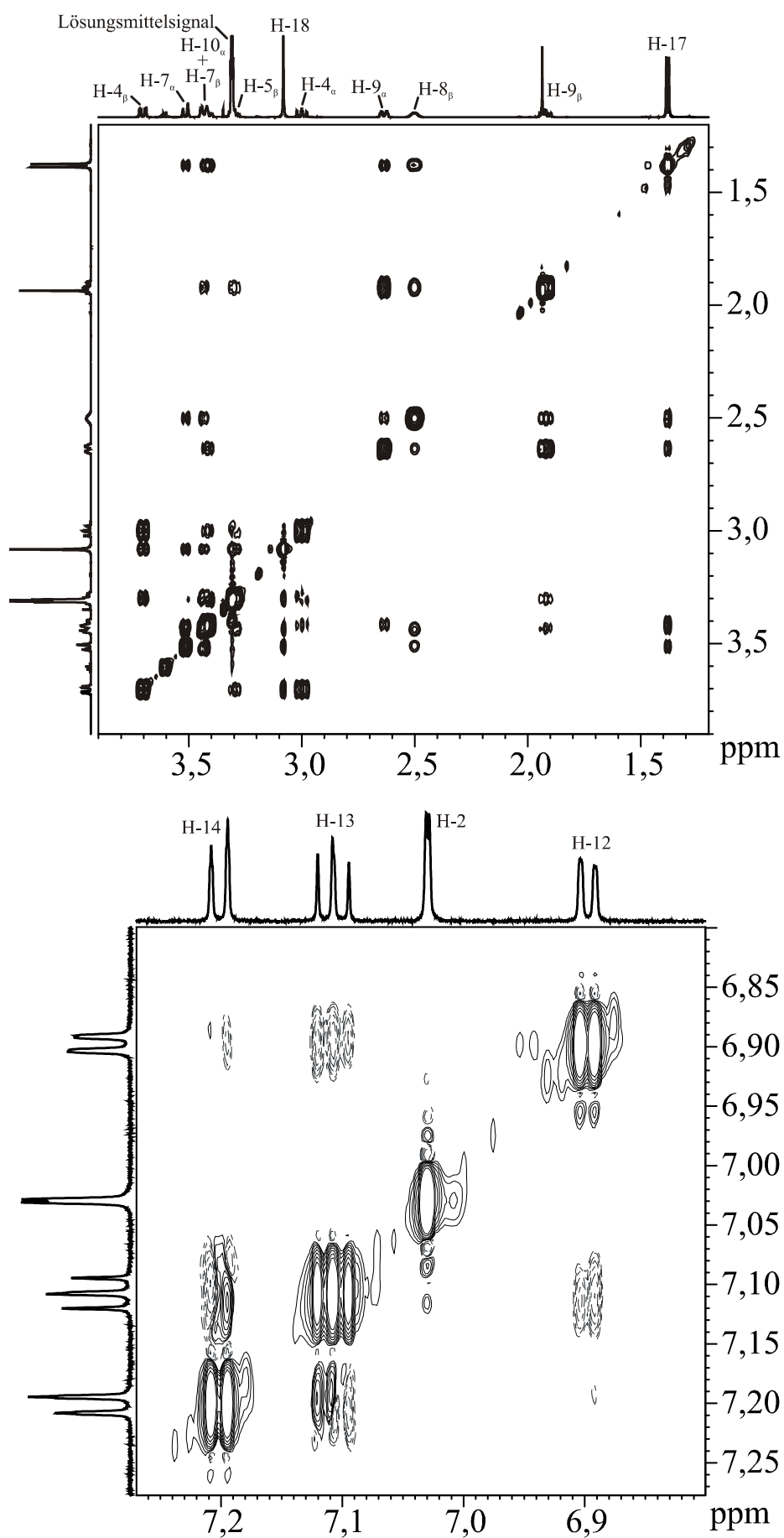


Abb. 6-41: Vergrößerungen des NOESY-Spektrums des Pyroclavins in protonierter Form aufgenommen in CD_3OD .

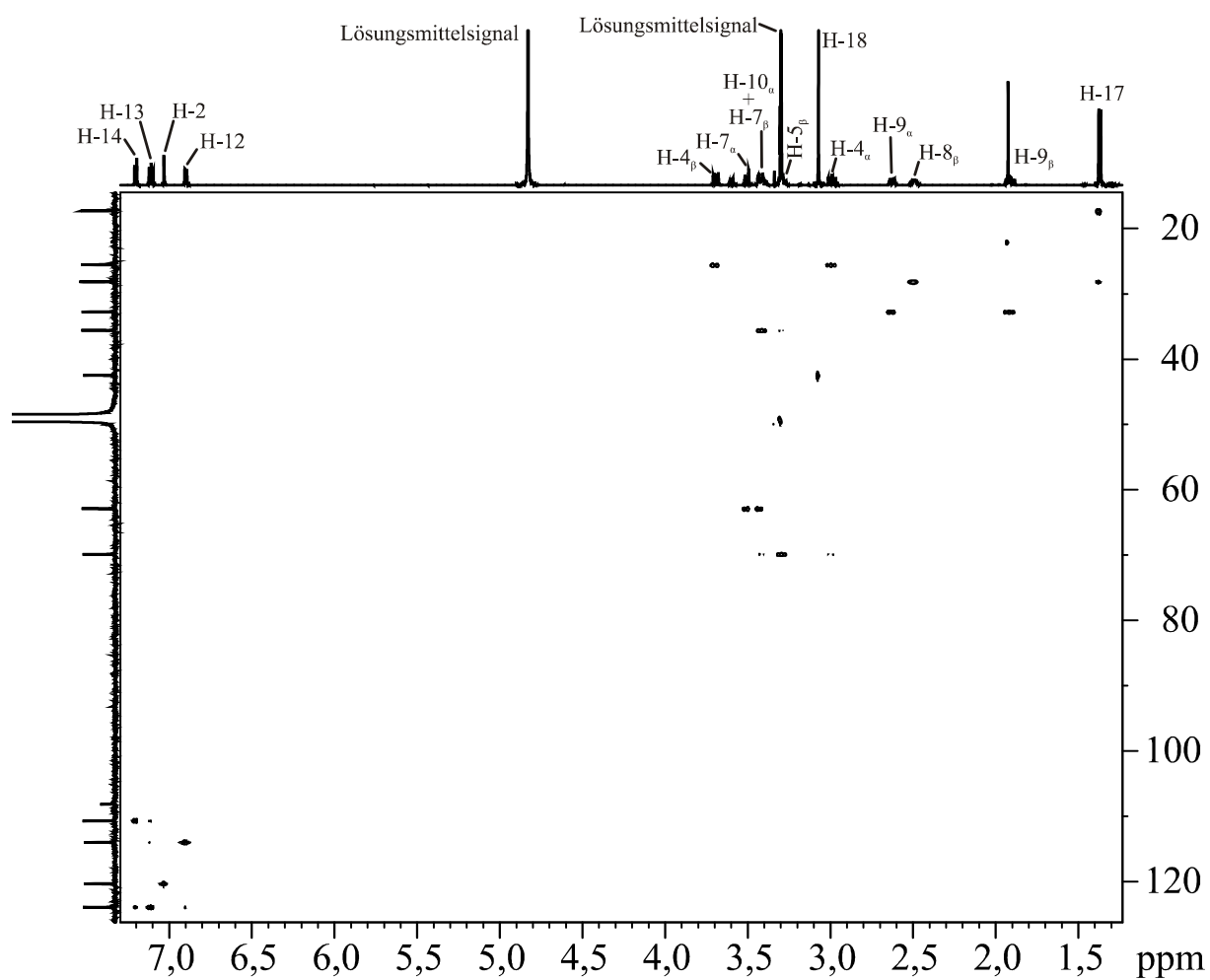


Abb. 6-42: HSQC-Übersichtsspektrums des Pyroclavins in protonierter Form aufgenommen in CD₃OD.

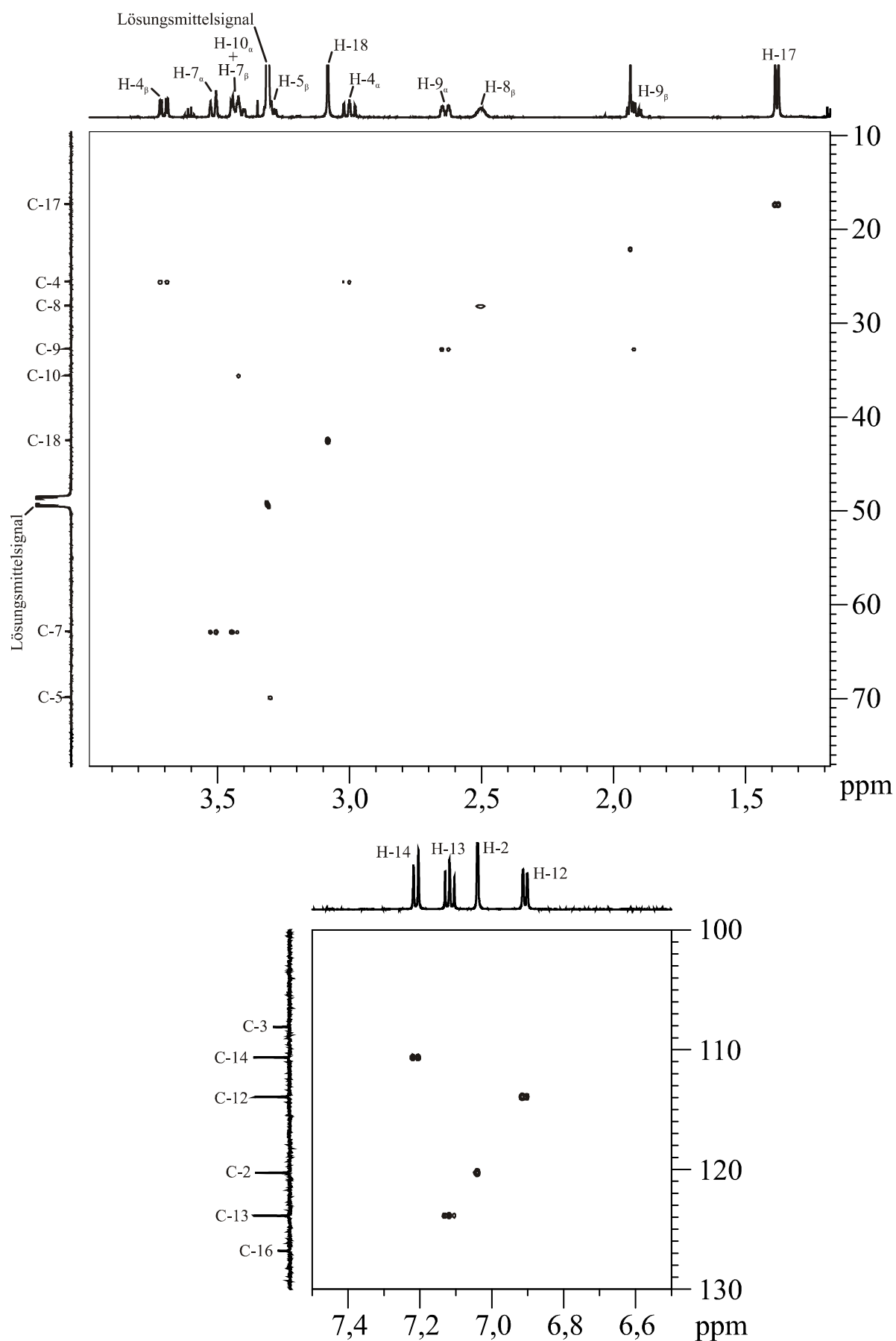


Abb. 6-43: Vergrößerungen des HSQC-Spektrums des Pyroclavins in protonierter Form aufgenommen in CD_3OD .

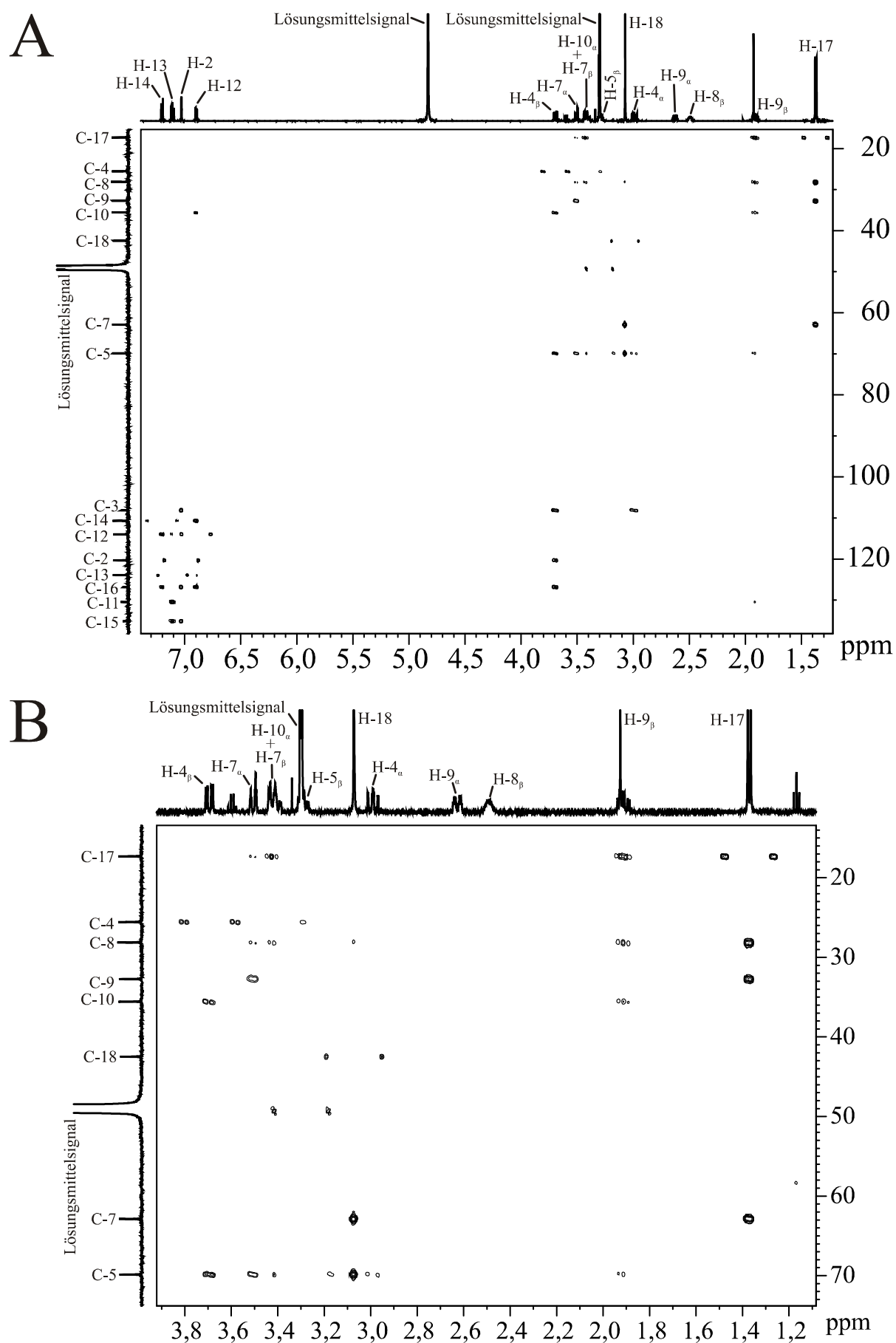


Abb. 6-44: HMBC-Übersichtsspektrum (A) und Vergrößerung (B) des Pyroclavins in protonierter Form aufgenommen in CD_3OD .

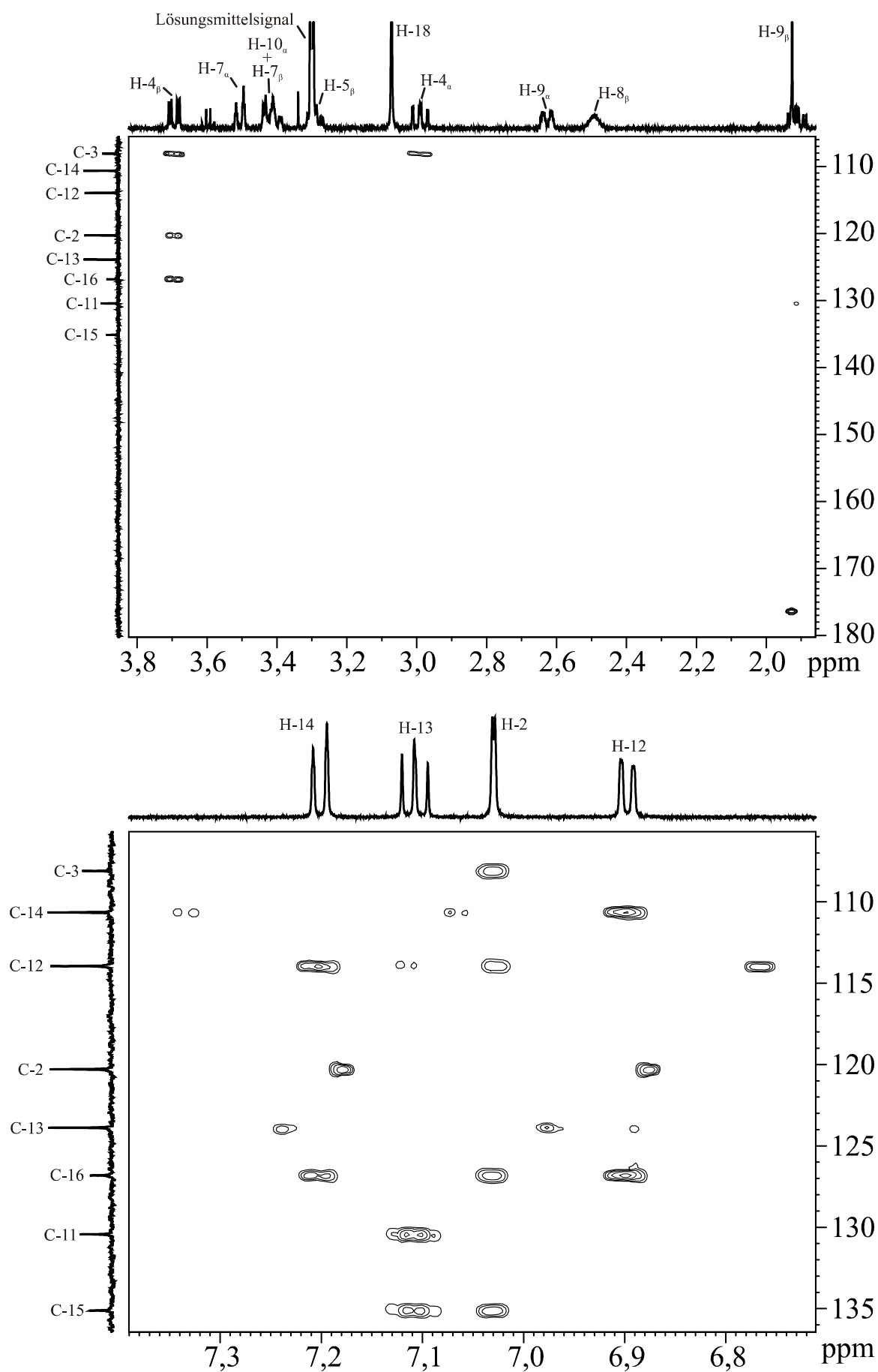


Abb. 6-45: Vergrößerungen des HMBC-Spektrums des Pyroclavins in protonierter Form aufgenommen in CD_3OD .

6.11 MS-Spektrum des isolierten Pyroclavins

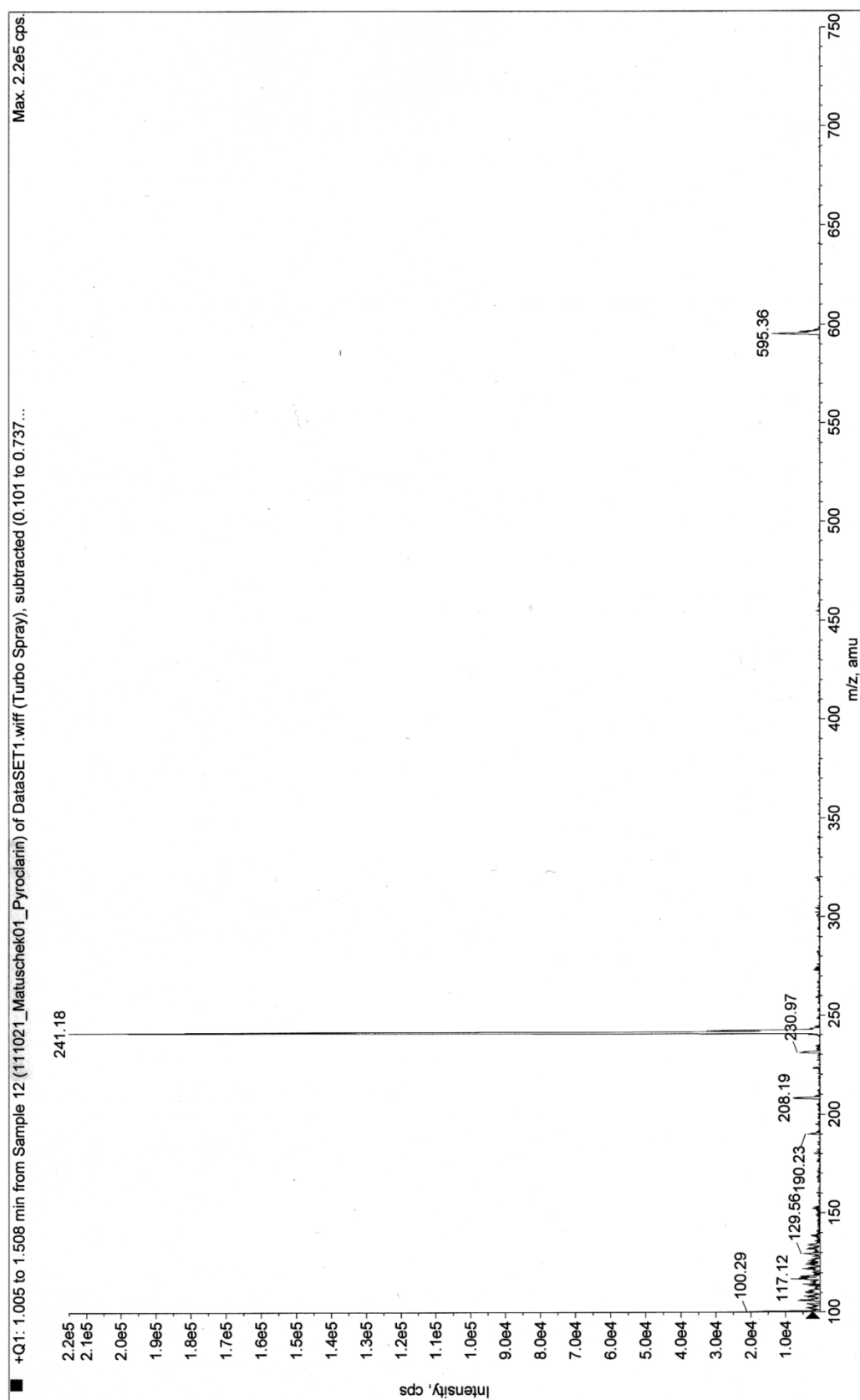


Abb. 6-46: Positives ESI-MS-Spektrum des isolierten Pyroclavins, theoretische Masse $[M+1]^+$: 241,17.

6.12 Membrandomänen-Vorhersagen für FgaOx1 und EasE

TMHMM-2.0	MSHR <u>IL</u> CVAFVCVCSLVAVSSIYSPFNHPIVYSNNAICFQLSTWRIPQLYLAVLIRRFDL
TMpred	MSHR <u>IL</u> CVAFVCVCSLVAVSSIYSPFNHPIVYSNNAICFQLSTWRIPQLYLAVLIRRFDL *****
TMHMM-2.0	SLSTRGVMLAVTVGVGSSQHHSQRSGLSLTFAMTPSMITLLVKTCVISQRTAVGEPHRPG
TMpred	SLSTRGVMLAVTVGVGSSQHHSQRSGLSLTFAMTPSMITLLVKTCVISQRTAVGEPHRPG *****
	Start EasE_NCBID ↓
TMHMM-2.0	WWEVGRTEDETC [↓] HAHSPRGAPCHQGRIPLYSAAVESVDQIQVAVRFAQRHRLRLVVRNT
TMpred	WWEVGRTEDETC [↓] HAHSPRGAPCHQGRIPLYSAAVESVDQIQVAVRFAQRHRLRLVVRNT
TMHMM-2.0	GHD [*] TAGRSSGSDSFQIHCHRMKQIEYHDNFRALGSDIDRGPVSVGAGVTLGEMYARGAR
TMpred	GHD [*] TAGRSSGSDSFQIHCHRMKQIEYHDNFRALGSDIDRGPVSVGAGVTLGEMYARGAR
TMHMM-2.0	DGWVVVGGECPVGAAGGFLQGGGVSSFH [*] SFIDGLAVDNVLEFEVVTA [*] KGDVVVANDHQN
TMpred	DGWVVVGGECPVGAAGGFLQGGGVSSFH [*] SFIDGLAVDNVLEFEVVTA [*] KGDVVVANDHQN
TMHMM-2.0	PDIFWALRGGGGGTFGIVTRATMRVHLNSPVCVSEVAVSGLRNNSLLWTKGITGLFSILR
TMpred	PDIFWALRGGGGGTFGIVTRATMRVHLNSPVCVSEVAVSGLRNNSLLWTKGITGLFSILR
TMHMM-2.0	SFNQQGIPGQFILRPLSKDQVNASLTLYSLNTDDTRRSAENMLSIRNILESTTLPFTLAS
TMpred	SFNQQGIPGQFILRPLSKDQVNASLTLYSLNTDDTRRSAENMLSIRNILESTTLPFTLAS
TMHMM-2.0	RCLPKISDALRKGPDMLPVNYGIITGSVLVSEDLFNSEEGPLHLAKQLEHFPMPGMDLLF
TMpred	RCLPKISDALRKGPDMLPVNYGIITGSVLVSEDLFNSEEGPLHLAKQLEHFPMPGMDLLF
TMHMM-2.0	TSNLGGNV [*] SANTGKKHRDTSMH [*] PGWRQAAHLIN [*] FVRSVSTPTAHEKARSLEELHSVQMRQ
TMpred	TSNLGGNV [*] SANTGKKHRDTSMH [*] PGWRQAAHLIN [*] FVRSVSTPTAHEKARSLEELHSVQMRQ
TMHMM-2.0	LYDIEPDRVSYRNLGDPLESDAAQVYWGPNYKRLLEIKRKWDPEDLFFSQLGVGSEGWT
TMpred	LYDIEPDRVSYRNLGDPLESDAAQVYWGPNYKRLLEIKRKWDPEDLFFSQLGVGSEGWT
TMHMM-2.0	EDQMCKRQQRLQQMLQYLMSSIAQRVYR
TMpred	EDQMCKRQQRLQQMLQYLMSSIAQRVYR

Abb. 6-47: Vergleich der Membrandomänen-Vorhersagen der Programme TMHMM-2.0 und TMpred für FgaOx1. Die putativen Membrandomänen wurden unterstrichen und das Startcodon der EasE-Proteinsequenz (NCBI-Datenbank) markiert. Die Konsensussequenz der Membrandomänen-Vorhersage beider Programme wurde durch „*“ markiert.

TMHMM-2.0 TMpred	<u>MYLLGPVACFALIASVLWAPSGRCRCRPWEPCWPSAADWHVLNDSLQGSLVRIRPVASV</u> <u>MYLLGPVACFALIASVLWAPSGRCRCRPWEPCWPSAADWHVLNDSLQGSLVRIRPVASV</u> ***** Start EasE_NCBI ↓
TMHMM-2.0 TMpred	CHGSEYDVAACANLSSLVVD SGWRTSNPNTLQDWVWEIGNGVVEEFCPYTTSPMERRQSIC CHGSEYDVAACANLSSLVVD SGWRTSNPNTLQDWVWEIGNGVVEEFCPYTTSPMERRQSIC
TMHMM-2.0 TMpred	PQGRLPLYSAVVRSTSDIQASVRFASRHNLRLVIKNTGHDSAGRSSAPHSFQIHTSLLQN PQGRLPLYSAVVRSTSDIQASVRFASRHNLRLVIKNTGHDSAGRSSAPHSFQIHTSLLQN
TMHMM-2.0 TMpred	ISLHKNFIARGSTTGRGPAVTLGAGVMQWQAYVHGAKNGYTILGGECPTVGAVGGFLQGG ISLHKNFIARGSTTGRGPAVTLGAGVMQWQAYVHGAKNGYTILGGECPTVGAVGGFLQGG
TMHMM-2.0 TMpred	GVSSIHSFTRGLAVDQVLEYQVVSANGDLITANEDNNQDLFWALKGGGGGTFGVVTEATV GVSSIHSFTRGLAVDQVLEYQVVSANGDLITANEDNNQDLFWALKGGGGGTFGVVTEATV
TMHMM-2.0 TMpred	RVFSDDPVTVTSTKIEAAAANVLFWKEGVHELLRLLQRFNNLHVAGQLVISAPTKDSLQA RVFSDDPVTVTSTKIEAAAANVLFWKEGVHELLRLLQRFNNLHVAGQLVISAPTKDSLQA
TMHMM-2.0 TMpred	GLELHFANLTDETQAIQLLRSEARAETHGISASTSVRVQRKASSELRMKPDVYPPHYGI GLELHFANLTDETQAIQLLRSEARAETHGISASTSVRVQRKASSELRMKPDVYPPHYGI
TMHMM-2.0 TMpred	LEASVLISAATFHANDGPALIASKLSGLTLKPNLILFTSNLGGRVSENTAIEIALHPAWR LEASVLISAATFHANDGPALIASKLSGLTLKPNLILFTSNLGGRVSENTAIEIALHPAWR
TMHMM-2.0 TMpred	EAAQLVTLVRVVEPSIEGKLSALNNLTARDVPILYSIDPAAKISYRNLGDPQEKEFQTRY EAAQLVTLVRVVEPSIEGKLSALNNLTARDVPILYSIDPAAKISYRNLGDPQEKEFQTRY
TMHMM-2.0 TMpred	WGADNYARLAATKAAWDPSHLFMTSLGVGSEVWDAEGICRKRGRFRAKASSLIGM WGADNYARLAATKAAWDPSHLFMTSLGVGSEVWDAEGICRKRGRFRAKASSLIGM

Abb. 6-48: Vergleich der Membrandomänen-Vorhersagen der Programme TMHMM-2.0 und TMpred für EasE, mit der in dieser Arbeit postulierten Proteinsequenz. Die putativen Membrandomänen wurden unterstrichen und das Startcodon der EasE-Proteinsequenz (NCBI-Datenbank) markiert. Die Konsensussequenz der Membrandomänen-Vorhersage beider Programme wurde durch „*“ markiert.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Shu-Ming Li für die sehr gute Unterstützung und Betreuung während meiner gesamten Doktorarbeit. Seine Tür stand für mich immer offen und er nahm sich Zeit für Gespräche. Zudem danke ich ihm dafür, dass ich China kennenlernen durfte, was für mich eine große Erfahrung war.

Prof. Dr. Michael Keusgen danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großer Dank geht an Dr. Xiulan Xie für die ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und 2D-NMR-Messungen, ohne die die Strukturaufklärungen von Agroclavin und Pyroclavin nicht möglich gewesen wären.

Dr. Kämpchen und Herr Newel aus der NMR-Abteilung danke ich für die Messung der ^1H -NMR-Spektren und für die Hilfe bei Problemen mit der Datenauswertung. Dr. Laufenberg und Frau Zitzer danke ich für die Durchführung und Hilfe im Rahmen der massenspektrometrischen Messungen.

Ein großer Dank gilt ebenfalls Prof. Leistner für die Bereitstellung des Chanoclavin-I, das für viele Experimente als Substrat gedient hat. Zudem danke ich Prof. Leistner für das Agroclavin und das Elymoclavin, die als Standards benutzt wurden.

Bei Prof. Thilo Stehle, seinem ehemaligen Diplomanten Marco Jost und seinem Mitarbeiter Dr. Georg Zocher (Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen) möchte ich mich für die Zusammenarbeit im Rahmen des FtmPT1 Kristallisations-Projekts bedanken.

Ein Dank geht natürlich auch an alle aktuellen und ehemaligen Institutskollegen für die schöne Zeit, die ich mit euch teilen durfte, darunter Aili, Alex, Anika, Anne, Beate, Carsten, Daniel, Edyta, Kathrin, Kirsten, Lena, Mike, Nici, Ole, Peter, Soheil, Stefan, Sylwia, Viola, Wen-Bing und Xia.

Many thanks to Huixi for the time you spend for us in Wenzhou. It was a great pleasure for me to see your hometown.

Liebe Chrissi, dir danke ich zu allererst für deine Geduld mit mir und natürlich für alle hilfreichen Diskussionen, ohne die mir vieles im Verlauf der Arbeit schwerer gefallen wäre. Außerdem danke ich dir für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Alexander Wallwey möchte ich dafür danken, dass er sich die Zeit genommen hat, diese Arbeit Korrektur zu lesen.

Mein persönlicher Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden außerhalb des Labors, die mich in den letzten Jahren unterstützt und viel Verständnis gezeigt haben.

Curriculum vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum/-ort: 18.12.1982 in Oberhausen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse: Rimbergstraße 1, 35094 Lahntal
E-Mail: Marco.Matuschek@rub.de

SCHULISCHE AUSBILDUNG

06.1989 – 06.1993 Emscherschule Oberhausen, Grundschule
06.1993 – 06.2002 Gesamtschule Alt-Oberhausen, Oberhausen
(NRW), Abitur

ZIVILDIENTST

10.2002 – 08.2003 Deutsches Rotes Kreuz Oberhausen (NRW),
Rettungshelfer

STUDIUM

10.2003 – 10.2006 Ruhr-Universität Bochum, Bachelor-Studium der
Biochemie mit dem Schwerpunkt „Biomolekulare
Chemie“

Bachelorarbeit: „Quantitative Charakterisierung
der Interaktion zwischen Ras und RASSF1C“
angefertigt in der Arbeitsgruppe Proteininteraktionen
bei Prof. Dr. Christian Herrmann

10.2006 – 10.2008 Ruhr-Universität Bochum, Master-Studium der
Biochemie mit dem Schwerpunkt „Proteine:
Struktur und biologische Funktion“

Masterarbeit: „Biochemischen Charakterisierung
von Septin-Komplexen“ angefertigt am Max-
Planck-Institut für molekulare Physiologie in
Dortmund in der Arbeitsgruppe von
Prof. Dr. Alfred Wittinghofer

PROMOTION

11.2008 bis heute Philipps-Universität Marburg, Promotion am
Institut für Pharmazeutische Biologie und Bio-
technologie bei Prof. Dr. Shu-Ming Li

FORSCHUNGSAUFENTHALTE

09.2010 Forschungsaufenthalt an der Universität Zhejiang in
Hangzhou, China